



FACULTAD DE MEDICINA

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE TERAPIA CELULAR E INGENIERÍA TISULAR
CON CÉLULAS TRONCALES SOMÁTICAS MESENQUIMALES PARA EL
TRATAMIENTO DE LAS FÍSTULAS TRAQUEOBRONQUIALES POSTQUIRÚRGICAS Y
DE LAS DE ORIGEN IATROGÉNICO

TESIS DOCTORAL

Prudencio Julio Díaz-Agero Álvarez

Madrid, 2015

D Rodolfo Álvarez-Sala Walther, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Medicina (Neumología) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Servicio de Neumología del Hospital Universitario La Paz, junto con D Mariano García Arranz, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid e investigador *senior* estabilizado en el Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz.

CONSIDERAN

Que el trabajo presentado por D Prudencio Julio Díaz-Agero Álvarez, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid, titulado “Desarrollo de una técnica de terapia celular e ingeniería tisular con células troncales somáticas mesénquimales para el tratamiento de las fistulas traqueo-bronquiales postquirúrgicas y de las de origen iatrogénico”, reúne las características de originalidad, rigor científico y calidad, para ser defendido como Tesis Doctoral en Medicina.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado

Madrid, 1 de septiembre de 2015

Firmado:

Dr Rodolfo Álvarez-Sala Walther

Dr Mariano García Arranz

A toda mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al Prof Dr D Rodolfo Álvarez-Sala Walther, Catedrático de Neumología, director de la tesis doctoral, por su amistad, talante, inteligencia, tenacidad y apoyo incondicional, sin los cuales no habría podido llevar a delante este proyecto.

Al Dr D Mariano García Arranz, director de la tesis doctoral, biólogo e investigador que me inspiró y ayudo sin límite en el desarrollo de esta nueva terapia.

Al Prof Dr D Damían García-Olmo, cirujano e investigador pionero en la utilización de las células troncales adultas para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, que puso las bases de la terapia celular en la patología quirúrgica.

Al Dr D Tihomir Georgiev Hristov, cirujano e investigador que ha colaborado conmigo en la misma línea de investigación por su generosidad al compartir ideas y trabajo.

A los integrantes del Servicio de Cirugía Plástica del Hospital Universitario La Paz (HULP), en especial al Dr D Francisco Leyva Rodríguez, por su labor esencial en la obtención del lipoaspirado de donde se extraen las células troncales mesenquimales.

Al Dr D Joaquín García Sánchez-Girón, mi actual Jefe de Servicio, por toda su ayuda en mi carrera profesional.

A mis compañeros del Servicio de Cirugía Torácica del HULP que siempre me han ayudado en la puesta en marcha de esta nueva terapia.

A todos los componentes de la unidad de terapia celular por su colaboración.

A los miembros de la unidad de endoscopia respiratoria por su buen hacer.

A todos los integrantes de la Sección de Anestesia y Reanimación Cardiorrespiratoria, en especial a mis amigos los doctores D Isidro Moreno Gómez-Limón y D José Del Campo Gil.

A la sección de sangrantes del Servicio de Aparato Digestivo por su colaboración, tanto científico-técnica como material, en especial a los doctores D José Manuel Suárez de Parga, D Pedro Mora Sanz y D María Dolores Martín Arranz.

Al Hospital Universitario La Paz donde me formé como alumno de Medicina y he trabajado durante los últimos 20 años.

Por último, a todos los que han colaborado y ayudado, tanto dentro como fuera del ámbito médico, en la elaboración de este proyecto.

ÍNDICE

I. Introducción

A. La patología fistulosa en el árbol traqueo-bronquial	8 .
1. Tipo, incidencia y factores de riesgo	9
2. Estrategias de tratamiento	11
3. Tratamiento endoscópico	12
B. La medicina regenerativa	13
1. Definición y estrategia de la medicina regenerativa	13
a. Terapia celular	14
b. Ingeniería tisular.	15
c. Órganos bioartificiales	19
2. Necesidad y promesas de la medicina regenerativa	19
3. Marco legislativo de la medicina regenerativa	22
C. Células troncales	23
1. Características, tipos y fuentes	23
2. Células troncales mesenquimales	29
3. Cicatrización y células troncales mesenquimales.	32
4. Técnicas de obtención y procesamiento de las células troncales mesenquimales de origen adiposo.	34
5. Técnicas de aplicación en el tejido diana.	35
D. Terapia celular e ingeniería tisular en el árbol traqueobronquial.	37
E. Innovación en cirugía, diseño de nuevos procesos.	40

II. Justificación, hipótesis y objetivos. 52

III. Material y métodos

A. Diseño del procedimiento de terapia celular e ingeniería tisular	60
B. Diseño de la técnica quirúrgica endoscópica.	60
C. Ámbito	61

D. Tipo de estudio y periodo.	61
E. Plan de trabajo, evaluación de las variables y seguimiento.	62
F. Población en estudio: criterios de inclusión y de exclusión	63
G. Pacientes.	64
H. Variables.	92
I. Metodología de las distintas fases.	101
J. Análisis de las variables principal y secundarias para aceptar o rechazar la hipótesis principal.	113

IV. Resultados

A. Caracterización de las células aplicadas a los pacientes.	142
B. Caso clínico número uno	143
C. Caso clínico número dos.	149
D. Caso clínico número tres	156
E. Caso clínico número cuatro.	167
F. Caso clínico número cinco.	172

V. Discusión

A. De la metodología	183
B. De los resultados.	187

VI. Conclusiones.

200

VII. Claves de abreviaturas.

202

VIII. Bibliografía

204

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

A. La patología fistulosa en el árbol tráqueo-bronquial

El árbol tráqueo-bronquial es la parte de la vía respiratoria que une el medio externo con el medio interno. Nuestra vía aérea esta diseñada tanto anatómica como fisiológicamente para mantenerse estéril y limpia. Esas condiciones son esenciales para poder realizar su función de intercambio gaseoso. La separación anatómica del árbol traqueo-bronquial con las vísceras vecinas es la barrera más importante para proteger la vía respiratoria. Además de su disposición anatómica, los conductos respiratorios están protegidos de la aspiración por el cierre de las cuerdas vocales durante la deglución y el reflejo de la tos, que se dispara fácilmente ante cualquier estímulo de la mucosa respiratoria.

Cuando se establece una fístula traqueo-bronquial se pierde la barrera anatómica que protege al tracto respiratorio de la aspiración de líquidos de diferente naturaleza, y se pone en riesgo la respiración pulmonar. Se abre así una puerta a la colonización e infección de la vía aérea.

1. Tipo, incidencia y factores de riesgo

Las fistulas de la vía aérea son trayectos patológicos, usualmente cortos, que comunican directamente la luz tráqueo-bronquial con algún espacio o víscera vecina. La fístula puede ser interna o externa con la piel. Las fistulas se clasifican normalmente combinado el nombre de la vía aérea con el nombre de la víscera o el espacio con el que se ha establecido la solución de continuidad. Así, hablamos de fistulas tráqueo-mediastínicas si se comunica la tráquea con un espacio patológico mediastínico y fistulas vásculo-traqueales cuando se une la luz de un gran vaso con la tráquea. En los casos de comunicación entre la tráquea y el esófago se usan indistintamente los términos tráqueo-esofágicas o esófago-traqueales. Cuando la fístula es de situación más distal a la tráquea se aplica el nombre de bronquial, fístula bronco-esofágica si se comunica esófago y bronquio y fístula bronco-pleural (FBP) cuando se comunica el espacio pleural y la luz bronquial.

Las fistulas pueden ser congénitas o adquiridas, siendo estas últimas las más frecuentes y dependiendo su incidencia de la etiología. Las fistulas postquirúrgicas después de realizar una cirugía de resección pulmonar, ya sea segmentectomía, lobectomía o neumonectomía, son las más frecuentes.

La incidencia de FBP postquirúrgicas es variable, situándose entre el 4,4 y 22%²⁻⁴. Aunque las causas que modifican su incidencia son muchas^{3, 5, 6}, las principales son el tipo de resección, la lateralidad (lado derecho o izquierdo) y la etiología por la que se indica la resección. Hay una gran diferencia entre el tipo de resección, para apreciarlo podemos tomar como ejemplo el trabajo de Asamura et al.⁷, que recoge 2359 resecciones por cáncer de pulmón hechas en un periodo de 28 años. La tasa global de FBP fue de 2,1%. Cuando desglosamos esta tasa por el tipo de resección vemos una distribución de FBP postsegmentectomía 0%, postlobectomía 1,2%, postneumonectomía 4,5%, postbroncoplastias 4,8% y postpleuroneumonectomía 10%. Si consideramos el lado operado: lobectomía dcha 1,7%, izqda 0,3%; neumonectomía dcha 8,6%, izqda 2,3%; broncoplastias dcha 6,9%, izqda 0%; pleuroneumonectomía dcha 25%, izqda 0%. La serie muestra que la FBP es un problema del lado derecho^{2, 8, 9} y principalmente de las neumonectomías.

Como hemos señalado previamente, la FBP también está fuertemente condicionada por la enfermedad subyacente. Cuando se hace la neumonectomía por procesos inflamatorios o infecciones primarias pulmonares, la incidencia de FBP se incrementa notablemente. Vemos que Pomerantz et al.¹⁰ tiene una tasa de FBP del 20% de las 40 neumonectomías realizadas por infección por *Mycobacterium tuberculosis* resistente.

La tasa de FBP se ha continuado reduciendo, alcanzándose cifras tan bajas como el 0,98%⁶. A pesar de su baja incidencia las consecuencias de su aparición para el paciente, suelen ser letales, con una mortalidad entre el 12,5-71,2%^{6, 11}. La alta mortalidad se debe normalmente a la aparición de neumonía por aspiración en el pulmón contralateral del contenido de la cavidad de neumonectomía¹².

Un indicativo del problema de salud que suponen estas fistulas son los datos expuestos a continuación. En el año 2013 se dieron 1,8 millones de casos nuevos de cánceres de pulmón a nivel mundial. Si tenemos en cuenta que el tratamiento quirúrgico del cáncer de pulmón en sus estadios iniciales sigue siendo el método de elección para lograr supervivencias prolongadas¹³ y sabemos que aproximadamente un 30% de esos 1,8 millones de pacientes podrán beneficiarse de

la cirugía, podemos estimar que unos 23.760 de ellos estuvieron en riesgo de tener fístula broncopleuraleal y fallecer como consecuencia. Si tomamos los datos de nuestro país, la incidencia en el 2012 fue de 26.715 casos nuevos de cáncer de pulmón, de los que unos 8.000 pacientes debieron ser intervenidos. Si les aplicamos la tasa del 4,4%², unos 353 pacientes estuvieron en riesgo de desarrollar FBP y por tanto de fallecer. En España la mortalidad de la FBP es más baja que la recogida en los países anglosajones, entre 5,4% y el 13,3%². Esto quizás se deba a la realización temprana de una toracostomía abierta. Esta impide la neumonía por aspiración del pulmón único contralateral¹², causa principal de mortalidad. La formación de una FBP no solo pone en riesgo la vida del paciente sino que se asocia a una morbilidad y pérdida de calidad de vida significativas.

Además de los factores de riesgo mencionados, hay múltiples causas implicadas en el desarrollo de una FBP⁶, situándose entre las más importantes la ventilación mecánica prolongada¹⁴ y la terapia de inducción⁹.

La incidencia de las fístulas esófago-traqueales con el uso de los balones de neumotaponamiento de baja presión y gran distensibilidad se ha reducido mucho y ahora es una rareza, menos del 1%¹⁵. Por contra, se siguen registrando fístulas esofago-traqueales iatrogénicas tras la realización de traqueostomía percutánea. Los factores asociados con la fístula esófago-traqueal son intubación traqueal prolongada, balones de neumotaponamiento de alta presión o hiperinsuflados, sonda simultánea nasogástrica de grueso calibre, desnutrición, infección respiratoria, hipotensión, hipoxemia, anemia, diabetes y tratamiento con corticoesteroides¹⁶.

La fístula tráqueo-innominada es muy rara pero sigue ocurriendo tras la realización de traqueostomías¹⁷.

Las fístulas tráqueo-mediastínicas son raras, suelen describirse como casos únicos. Se dan en el curso de tratamientos oncológicos de las neoplasias¹⁸.

2. Estrategias de de tratamiento

Las consecuencias de la instauración de las FBP son dos, el paso del contenido pleural al pulmón contralateral produciendo la mencionada neumonía por aspiración y la contaminación de la cavidad pleural con la formación de un empiema. Clínicamente el paciente comenzara a expectorar contenido líquido o purulento procedente de la cavidad pleural. En la radiografía de tórax aparecerá una cámara pleural y en las neumonectomías se vera un descenso del nivel

hidroaereo de la cavidad pleural. El diagnóstico se confirma fácilmente por broncoscopia, siendo excepcional el tener que recurrir a otros métodos¹.

Si exceptuamos las fistulas del árbol tráqueo-bronquial con los vasos, donde el control de la hemorragia es mandatorio, en el resto de las fistulas, la estrategia inicial debe ir dirigida a proteger el pulmón de la aspiración de contenido pleural o esofágico. En la FBP el vaciado de la cavidad pleural con un drenaje torácico es el primer paso para prevenir la aspiración. El decúbito lateral del lado de la fistula también es protector. En las fistulas esófago-traqueales la colocación de un balón en la tráquea por debajo de la fistula.

Los siguientes pasos vendrán determinados por el tipo de fistula y las condiciones del paciente¹⁹.

3. Tratamiento endoscópico

Desde la introducción del broncofibronscopio su utilización no sólo como instrumento diagnóstico de las fistulas sino como modalidad terapéutica ha ido ganando aceptación. El primer tratamiento endoscópico de una FBP se hizo en 1977²⁰. Desde entonces muchos tratamientos con diferentes sustancias y dispositivos se han publicado. Cabe citar el etanol, el nitrato de plata, el cianocrilato, el glutaraldehído, el adhesivo de fibrina y los antibióticos, entre otros muchos²⁰.

El interés por desarrollar tratamientos broncoscópicos que permitan tratar las fistulas broncopleurales ha seguido creciendo, en los últimos años la capacidad de inventiva para diseñar nuevos procedimientos para el tratamiento de las fistulas broncopleurales no parece tener fin²¹.

La efectividad del tratamiento con broncoscopia ha sido analizada por West et al.²² encontrando una mortalidad asociada del 40%. Los autores recomiendan su uso como última alternativa. Recientemente usando un agente esclerosante venoso (*polidocanol*) Cardillo et al.²³ han publicado resultados que llegan a ser comparables con la cirugía abierta. Estos autores desarrollan además un protocolo de decisión terapéutica basado en el tamaño de la FBP.

El tratamiento de las fistulas esófago-traqueales suele hacerse de forma paliativa con la colocación de dobles endoprótesis una en la vía aérea y otra en el esófago²⁴.

B. La medicina regenerativa

1. Definición y nacimiento de la medicina regenerativa

La medicina regenerativa se puede definir, de una forma genérica, como la disciplina que trata sobre los procesos de ingeniería y crecimiento tisular dirigidos a desarrollar substitutos biológicos de diferentes órganos y tejidos humanos que sean completamente funcionales. Estas técnicas se llevan a cabo *in vitro* o *in vivo* y su fin último es lograr el recambio de los tejidos y órganos dañados por otros nuevos ²⁵. Comprende, al mismo tiempo, el uso de los procesos fisiológicos de regeneración de los tejidos y de los órganos en los adultos para inducir *in vivo* la reparación y la autoregeneración de los tejidos y órganos lesionados. Es decir, se quiere hacer nacer de nuevo partes o funciones en individuos ya completamente maduros, que han perdido su estructura funcional, por procesos patológicos o por envejecimiento ²⁵.

El término de medicina regenerativa fue empleado por primera vez por Haseltine ²⁶ en 1999 en el curso de una conferencia. Daar y Greenwood ²⁷ propusieron la siguiente definición: "La medicina regenerativa es un campo emergente, interdisciplinario de investigación y aplicaciones clínicas enfocadas a la reparación, reemplazo o renovación de las células, tejidos u órganos, para restaurar la función dañada por cualquier causa, de origen congénito, enfermedades adquiridas, traumatismos o procesos de envejecimiento. Para lograr esa reparación hace uso de una combinación de diferentes estrategias tecnológicas, que se sitúan más allá de los tradicionales trasplantes o terapias de sustitución". Estas aproximaciones tecnológicas incluyen, entre otras, el uso de células troncales, de moléculas solubles, de ingeniería genética, de ingeniería de tejidos y de terapia celular avanzada, pero pueden extenderse a otras más ^{28, 29}.

Según Haseltine ²⁶ la expresión medicina regenerativa se usa en la actualidad de una manera más restringida, para referirse sólo a las terapias que emplean células troncales. Finalmente, el término *regenerative medicine* fue introducido en la base de datos *Medline* en el año 2004.

La medicina regenerativa puede subdividirse fundamentalmente en tres estrategias de aplicación²⁵: terapia celular, ingeniería tisular y órganos bioartificiales. En las siguientes secciones revisaremos estas estrategias.

a. Terapia celular

En sentido genérico implica el uso de células vivas para restaurar, mantener o mejorar la función de los tejidos y de los órganos. Su objetivo es el reemplazo de células enfermas o dañadas por otras nuevas funcionalmente activas. Específicamente conlleva el empleo de células

troncales que, inyectadas en la circulación sistémica o trasplantadas al órgano dañado, permiten su regeneración, restaurando su estructura y su función. Este procedimiento es conocido como terapia celular. El instituto *Federal Drug Administration* de los Estados Unidos de América define la terapia celular somática como la administración a humanos de líneas celulares no embrionarias, autólogas, alogénicas o xenogénicas (excluyendo la transfusión de hemoderivados) que han sido manipuladas o procesadas *ex vivo* a través de su propagación, expansión, selección, o tratamiento farmacológico, o han sufrido cualquiera otra alteración de sus características biológicas^{30, 31}.

El desarrollo de la terapia celular somática se inició con la inyección intravenosa de células troncales hematopoyéticas alogénicas de la médula ósea a los pacientes con leucemia que habían recibido quimiorradioterapia^{32, 33}. Estas células troncales eran capaces de restaurar completamente el sistema hematopoyético, incluyendo todas las líneas celulares: linfocitos, leucocitos, hematíes, y plaquetas, que habían sido eliminadas por la quimiorradioterapia. Desde entonces se han llevado a cabo en el mundo más de 200.000 trasplantes de células troncales hematopoyéticas, con un índice anual de 40.000 trasplantes³⁴. En la actualidad el trasplante de médula ósea es una terapia celular de tratamiento de múltiples enfermedades hematológicas bien establecida, que beneficia a miles de pacientes cada año.

Promovido por el éxito del trasplante de médula ósea, se ha desencadenado una expansión de la terapia celular que busca reparar los daños ocasionados por múltiples y diversas enfermedades. Una enumeración de las terapias celulares usadas da una visión de su difusión. Esta comienza con las terapias de sustitución para epitelios dañados, como la piel después de sufrir quemaduras o la cornea afectada por queropatías o como el déficit de células troncales del limbo. Continuaría con su utilización en enfermedades neurológicas como el Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica o el daño traumático de la médula espinal. Seguiría con la regeneración de hueso, de cartílago, del miocardio, el tratamiento de enfermedades pulmonares, de enfermedades metabólicas como la diabetes, de problemas quirúrgicos como la incontinencia urinaria o las fistulas del tracto digestivo, por mencionar sólo unos pocos ejemplos sin hacer un recuento exhaustivo. Así, un considerable número de estas terapias está siendo evaluado dentro de ensayos clínicos, que se encuentran en distintas fases.

b. Ingeniería tisular

El término ingeniería tisular se empleó por primera vez en 1987 durante una reunión del comité de la “*National Science Foundation*”³⁶. La ingeniería tisular propone la generación de tejidos y órganos completos mediante el uso combinado de células troncales junto con matrices. Es un campo interdisciplinar donde se combinan conocimientos de bioingeniería junto con biología molecular, biología celular, medicina y cirugía. Implica más que una mínima manipulación, ya que hay que cultivar, expandir y diferenciar las células dentro de matrices diseñadas con ese propósito. La ingeniería tisular es, por tanto, un procedimiento mucho más complejo y elaborado que la terapia celular. El trabajo seminal que dio lugar a las bases de la ingeniería tisular fue publicado en 1993 por Langer y Vacanti³⁷. La línea de separación entre la terapia celular y la ingeniería tisular es muy delgada e implica fundamentalmente, como rasgo diferenciador, la utilización por parte de la ingeniería tisular de matrices. De hecho, la legislación española y europea no distingue entre terapia celular e ingeniería tisular, considerándolas dentro del mismo tipo de terapias avanzadas.

Por tanto, el aspecto esencial en la ingeniería tisular es el empleo de una matriz extracelular transitoria o permanente, que facilita a las células su crecimiento hasta neoformar la estructura tridimensional del tejido u órgano que se quiere regenerar. Uno de los campos más activos de investigación es precisamente el desarrollo y diseño de matrices para la ingeniería tisular. Se emplean tanto matrices de origen biológico como sintético.

Tal como lo definieron Langer y Vacanti³⁷ los tres elementos implicados en la ingeniería tisular son: las células; la matriz extracelular y los factores de diferenciación y señalización celular (figura 1). La combinación de estos tres elementos, por medio del cultivo conjunto es clave para la obtención de tejidos y órganos. El cultivo se puede hacer en dos entornos diferentes: *in situ*, en el interior del propio organismo o *ex vivo*, fuera del organismo. En este último caso se requieren técnicas de cultivo tridimensionales, que se logran con los biorreactores. El cultivo *in situ* posee las ventajas de que es el propio organismo el que actúa como biorreactor, es más sencillo, menos costoso y se aplica de forma inmediata sin generarse demora hasta la obtención del órgano. El cultivo *ex vivo* es más complejo, más caro y más largo, ya que hay que reproducir en el laboratorio las condiciones del organismo e implica el cultivo del tejido en biorreactores en condiciones de asepsia durante periodos de semanas.

Figura 1.- Principios de la ingeniería tisular



Se puede concluir que el núcleo primordial de la ingeniería tisular es la matriz, con ésta se logra el cultivo en 3D. En un principio se tenía una idea muy simplista sobre la matriz extracelular, dándole un papel meramente mecánico de soporte, muy poco activo. Esa visión se ha ido abandonando según se conocían las complejas relaciones que se establecen entre las células y el medio extracelular. La matriz extracelular no sólo guía espacialmente el crecimiento celular sino que lo modifica, induciendo la expresión de unas características celulares u otras. La acción se lleva a cabo tanto por las moléculas y las proteínas que constituyen la matriz como por las fuerzas mecánicas de cizallamiento.

La matriz extracelular, también llamada sustancia intercelular, es un entramado de moléculas, proteínas y carbohidratos que se disponen en el espacio que dejan las células entre sí y que es sintetizado y secretado por las propias células. La matriz extracelular es propia de cada tejido. Los elementos básicos que las constituyen son colágenos de diferentes tipos, glucoproteínas, ácido hialurónico, proteoglicanos, glucosaminoglicanos, elastina, fibronectina, laminina y vitronectina, además de otras tales como factores de crecimiento, citoquinas y diversas enzimas. Los constituyentes de la matriz extracelular son compartidos por la mayoría de los organismos eucariotas, explicando la ausencia de respuesta inmune o de rechazo después de los xenotrasplantes de matrices extracelulares³⁸.

Las matrices que se emplean en la ingeniería tisular pueden ser de tres tipos: biológicas (polímeros naturales y matrices naturales obtenidas de tejidos u órganos

descelularizados), sintéticas (compuestos cerámicos y polímeros sintéticos) y compuestas (mixtas).

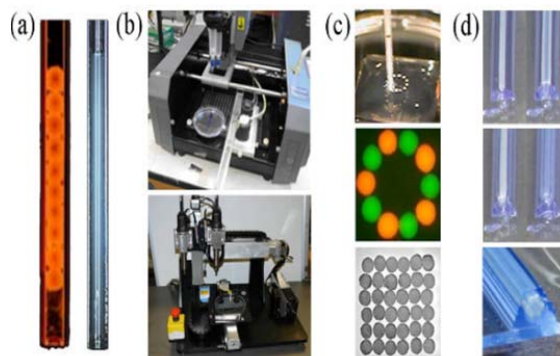
Las características básicas que deben de poseer estos compuestos para ser usados como matrices son alta porosidad, gran superficie de contacto celular, estructura constante, forma tridimensional y biocompatibilidad.

La obtención de matrices para la ingeniería tisular puede hacerse de dos formas diferentes, creándolas *de novo*, de modo completamente artificial al fabricarlas con diferentes técnicas y sustancias, fundamentalmente polímeros; o bien utilizando las que ya existen en la naturaleza. Los polímeros naturales son una opción muy atractiva, fundamentalmente por las similitudes que tienen con la matriz extracelular. Gracias a esta similitud no estimulan la inflamación, evitando la inflamación crónica así como reacciones tóxicas o inmunológicas. Mano³⁹ realiza una revisión exhaustiva de los polímeros bioabsorbibles más empleados en la ingeniería tisular. Entre esos se encuentran los adhesivos de fibrina que mimetizan la cascada de la coagulación, que tiene lugar en el organismo como primera fase en la cicatrización de las heridas, poseen además la ventaja de que facilitan su inyección, característica muy adecuada para que este polímero permita ser un vehículo de las células troncales⁴⁰. Otra forma de obtener matrices es utilizar la matriz extracelular de diferentes órganos y estructuras ya presentes en los organismos, por ejemplo en tráqueas, pulmones, corazones, hígados, etc. Para obtener la matriz, primero hay que eliminar las células de organismo donante por medio de un proceso de descelularización. Una vez eliminado el componente celular de órganos o tejidos cadavéricos, la matriz extracelular se somete a un proceso inverso de celularización, con las células de receptor, por medio de un cultivo en 3D en biorreactores. Las células que se suelen utilizar son células troncales.

En el primer caso, en el desarrollo *de novo* de matrices, se dispone de tres tecnologías que consiguen la fabricación de las nanofibras, que es la escala en la que se construyen las matrices. Estas son la separación de fases, el auto-ensamblado y el “*electrospinning*”, siendo esta última la más empleada⁴¹.

Recientemente se ha ingeniado otra forma de ingeniería de tejidos directa, la técnica de “*bioprinting*”⁴², que en un solo paso construye la matriz junto con el componente celular. En la bioimpresión se emplean impresoras en 3D (figura 2).

Figura 2- Componentes de la tecnología de bioimpresoras en 3D



Los componentes de la tecnología de la ingeniería de tejidos basada en la bioimpresión en 3D. (a) Muestra el cartucho de la impresora llena de biotinta, es decir, de unidades de bloques multicelulares. (b) La bioimpresora. (Foto superior: Impresora de Neatco, Carlisle, Canadá; foto inferior: Impresora de Organovo-Invetech, San Diego). © Los esferoides se entregan uno a uno en la biopapel (d) El mismo proceso de aposición capa por capa en el caso de las unidades cilíndricas en el biopapel (en azul)⁴²

De todo lo dicho, se deduce que el diseño y la selección de la matriz (biomaterial) es el escalón crítico en la ingeniería de tejidos. La matriz ideal debería de ser biocompatible, favoreciendo las interacciones celulares y el desarrollo tisular, no ser tóxica, tener propiedades físicas semejantes a las de los tejidos naturales, poseer una microestructura tridimensional con poros interconectados, dar soporte mecánico, liberar de forma controlada moléculas bioactivas, ser biodegradable, bioabsorbible y que permitan la regeneración de un nuevo tejido sin generar inflamación⁴³.

c. Órganos bioartificiales

En esta disciplina se quieren desarrollar dispositivos bioartificiales que puedan dar soporte a fallos agudos de funciones vitales como la hepática o la renal.

Incluiría tanto el desarrollo del componente biológico, células comprometidas con la función requerida, como de matrices artificiales. Estas matrices, además de lograr el soporte celular en 3D, actuarían como interfase con la sangre o el plasma del paciente. Su diseño y desarrollo sería muy parecido a la ingeniería tisular, pero se diferenciaría de ésta en dos aspectos importantes. En primer lugar se diseñarían como dispositivos extracorporales más que como órganos bioartificiales implantables. Esa distinción es crucial, ya que la construcción de órganos bioartificiales exógenos es más fácil y menos exigente que el proceso de certificación y los requerimientos legislativos que se piden a los dispositivos corporales. En segundo lugar, al

mismo tiempo al ser un dispositivo externo sería más factible el uso de células de origen xenogénico²⁵.

Aunque se ha conseguido el desarrollo de hígados y riñones bioartificiales, que han demostrado ser eficaces en dar soporte clínico a situaciones de fallo hepático y renal agudo, donde se ha producido un importante avance ha sido en el desarrollo de órganos bioartificiales con fines experimentales, permitiendo desarrollar modelos funcionales de pulmones vivos *ex vivo*⁴⁴.

2. Necesidad y promesas de la medicina regenerativa

Cada año en el mundo un número muy elevado de pacientes sufren pérdidas de tejido o fallo orgánico en fase terminal. El tratamiento habitual en estos casos es el trasplante de órganos desde otro individuo histocompatible. En la actualidad son procedimientos establecidos el trasplante de riñón, de hígado, de intestinos, de páncreas, de pulmón y de corazón. Es en este área de los trasplantes donde España es pionera en el mundo. En el año 2011 se alcanzó un nuevo récord histórico de trasplantes, con 1.667 donantes. Gracias a éstos se pudieron hacer 4.218 trasplantes, lo que supuso un incremento de un 11,8% respecto al año anterior y 445 enfermos trasplantados más. En definitiva, se elevó la tasa de donación a 35,3 donantes por millón de población frente a los 32 de 2010. En ese año se efectuaron 2.494 trasplantes renales, 1.137 hepáticos, 237 cardíacos, 230 pulmonares, 111 de páncreas y 9 de intestino, según datos de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT)⁴⁵.

A pesar del éxito de esta estrategia, los trasplantes se enfrentan a dos dificultades esenciales: el número insuficiente de donantes para dar respuesta a la demanda de órganos y el rechazo del órgano trasplantado por el sistema inmune del receptor.

Un ejemplo de esta situación es el trasplante de pulmón, donde la brecha entre los donantes de órganos y la demanda se ensancha cada vez más. Esto ha conducido a un aumento del tiempo de permanencia en las listas de espera. Por otra parte, de los trasplantes de pulmón llevados a cabo un 36% tienen rechazo agudo y un 50% rechazo crónico.

Existe, por tanto, una demanda clara y creciente de órganos compatibles que no sufran rechazo. La medicina regenerativa y la ingeniería tisular tratan de responder a esta necesidad a través del desarrollo de órganos a partir de las propias células autólogas, aplicando una terapia individualizada.

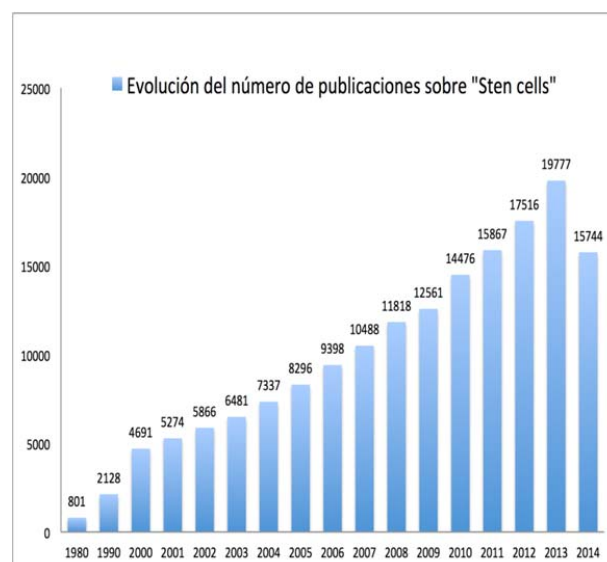
Pero los objetivos que se plantea la medicina regenerativa son más amplios que la sustitución de órganos en fase terminal:

- Reparar órganos y tejidos envejecidos, dañados o enfermos con recambios vivos, cultivados específicamente para cada paciente
- Descubrir y conocer cuales son los mecanismos naturales de regeneración de los tejidos y de ontogénesis embrionaria
- Disponer modelos experimentales con células o tejidos humanos para ensayar nuevos fármacos sin tener que recurrir a animales de experimentación
- Usar las células troncales como vehículos para liberar genes en tejidos específicos

Las promesas que quiere cumplir la medicina regenerativa, por tanto, son establecerse como una herramienta terapéutica, que ayude de forma significativa a los pacientes, y conseguir el desarrollo de modelos humanos de enfermedad.

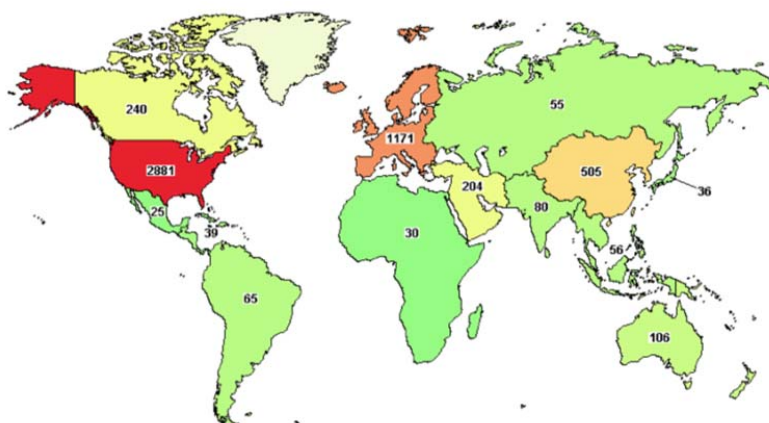
No es de extrañar que la medicina regenerativa haya despertado unas enormes expectativas. Un reflejo de ese interés es el número de publicaciones sobre células troncales, que ha crecido de forma sostenida desde 1980 (figura 3).

Figura 3.- Evolución de las publicaciones sobre “*stem cells*” en pubmed



Esto también se aprecia en un aumento de ensayos clínicos registrados en la base de datos norteamericana *Clinical trials.gov*, en donde si buscamos el término “*stem cells*” encontramos más de 5400 ensayos clínicos, con una distribución en la que Europa ocupa un segundo lugar detrás de USA en la ejecución de estos estudios controlados (Figura 4).

Figura.-4 Distribución mundial de los ensayos clínicos donde se emplean células troncales



3. Marco legislativo de la medicina regenerativa

En la Comunidad Europea y en España se ha legislado detalladamente sobre la terapia celular somática cuando ésta implica manipulación o alteración de sus características celulares *ex vivo*, ya sea con fines diagnósticos o terapéuticos. Según esta legislación se considera medicamentos de terapia celular somática a las células somáticas vivas empleadas en seres humanos, tanto autólogas (procedentes del propio paciente) como alogénicas (de otro ser humano) o xenogénicas (de animales), cuyas características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación para obtener un efecto terapéutico, de diagnóstico o preventivo por medios metabólicos, farmacológicos e inmunológicos. Dicha manipulación incluye la expansión o activación de poblaciones celulares autólogas *ex vivo* (por ejemplo, inmunoterapia adoptiva) y el uso de células alogénicas y xenogénicas asociadas con productos sanitarios empleados *ex vivo* o *in vivo* (por ejemplo, microcápsulas, matrices y andamiajes intrínsecos, biodegradables o no biodegradables)⁴⁶. En esta legislación sobre terapia

celular somática no se distingue entre terapia celular e ingeniería tisular. El punto esencial de la legislación española y europea es que cuando existe una manipulación clara de las células, por ejemplo expansión *in vitro* o alteración de sus propiedades o modificaciones genéticas, la terapia celular se debe considerar un medicamento y como tal aplicarse las directivas de ensayos clínicos propias de estos medicamentos previas a su autorización por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Sin embargo, es patente que a la terapia celular no se le puede aplicar la misma metodología de farmacocinética, toxicología, etc., que se emplea para evaluar las drogas. En estos momentos todavía se carece de un proceso específico para valorar este nuevo tratamiento biológico. El principal problema que se quiere abordar es como garantizar la seguridad para el paciente con estas terapias avanzadas. Sobre todo, que se excluya la posibilidad de efectos cancerígenos con este tratamiento. La legislación previamente citada permite dos tipos de procedimientos para aplicar la terapia celular:

- En el primero las células troncales autólogas, una vez extraídas del individuo y aisladas desechándose el resto de los componentes tisulares, no se someten a un proceso de expansión o modificación y son aplicadas directamente en el tejido diana. En este primer caso, al no existir una manipulación, no se le aplicaría la directiva de la Comunidad Europea ni la Española sobre terapia celular y no se considerarían las células como un medicamento sino como un trasplante autólogo.

- En el segundo las células troncales autólogas, una vez extraídas y aisladas, son sometidas a un proceso *ex vivo* de expansión (cultivo en placas para lograr su proliferación y aumentar su número) que suele durar varias semanas. En este segundo caso si se aplicaría la directiva europea y española sobre terapia celular. Esas células así manipuladas son consideradas un medicamento nuevo y su uso tiene todas las restricciones recogidas en la legislación mencionada anteriormente.

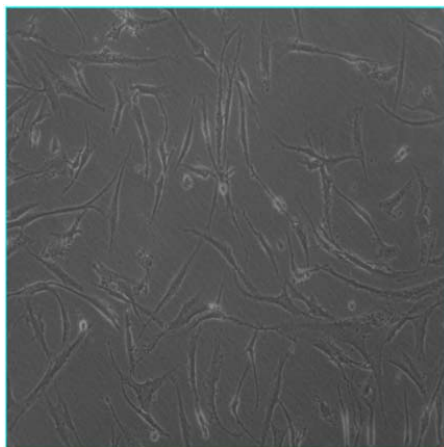
C. Células troncales

1. Características, tipos y fuentes

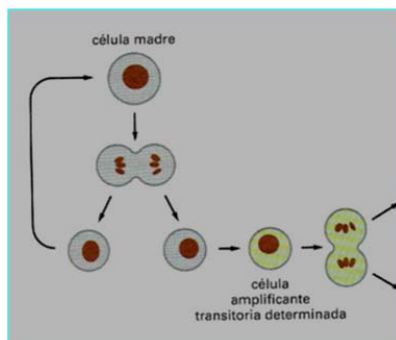
El concepto de células troncales se postuló de una forma teórica a finales del siglo diecinueve, para explicar la capacidad que tienen ciertos tejidos (sangre, piel, mucosas, etc.) de

regenerarse de forma muy prolongada, al menos durante la vida del individuo. A pesar de que las células de estos tejidos son de ciclo vital corto y mueren rápidamente, son sustituidas por otras nuevas a partir de las denominadas células troncales⁴⁷. Se establece así en estos tejidos, un flujo celular continuo que va desde la célula troncal a la célula especializada, que finalmente muere a través de un proceso de apoptosis, inducido por el desgaste. Las células troncales se definen como células relativamente indiferenciadas, que tienen la propiedad de autorrenovarse de forma indefinida a lo largo de la vida del sujeto por medio de divisiones asimétricas. Logran, al mismo tiempo, mantener la población de células troncales y la formación de células progenitoras que se diferencian en células especializadas. Esto posibilita el remplazo de las células perdidas. Estas células permanecen en un estado de indiferenciación en sus nichos, pero tienen la capacidad de diferenciarse en una o múltiples estirpes celulares. Una dificultad importante a la hora de describir e identificar las células troncales es que se distinguen por su funcionalidad y por su potencialidad de diferenciación, no por su morfología, pues no poseen ningún rasgo específico. En la figura 5 se muestra una fotografía microscópica de células troncales mesenquimales (CTM) derivadas del tejido adiposo tomada en un cultivo *in vitro*.

Figura 5.- Visión microscópica de las células troncales mesenquimales procedentes de la grasa



Al estar en un estado de indiferenciación, la mayoría de ellas, carecen de marcadores específicos⁴⁸. La principal característica de las células troncales es su capacidad de llevar a cabo divisiones celulares asimétricas, es decir, las dos células resultantes de la división son distintas (figura 6).

Modificado de Alberts et al.⁴⁹

Una permanecerá indiferenciada en estado basal, como célula troncal, pudiendo tener nuevas divisiones asimétricas. La segunda iniciará un proceso de diferenciación y de especialización hacia un tipo celular propio de cada tejido. La división asimétrica consigue que siempre exista una población estable de células troncales como reserva para necesidades de regeneración de los tejidos en la edad adulta. En caso de necesidad las células troncales también pueden hacer divisiones simétricas.

Las propiedades que definen a las células troncales serían:

1. Son células que en su mayoría (las células troncales hematopoyéticas si tienen marcadores propios) carecen de marcadores de diferenciación específicos.
2. Son inmortales o pueden dividirse por tiempos muy prolongados, por lo menos durante toda la vida del animal y tienen gran capacidad clonogénica.
3. Son capaces de división asimétrica, las dos células resultantes de la división son diferentes. Una de las células hijas mantiene el estado indiferenciado como célula troncal, perpetuando la población de las células troncales, mientras que la otra inicia una diferenciación hacia un linaje celular determinado.
4. Esa diferenciación es múltiple, pudiendo dar células hijas de distintas estirpes. Cuanto más primitiva es la célula troncal mayor capacidad de diferenciación tiene. Esta es máxima en el cigoto.

5. El proceso de diferenciación lo llevan a cabo a través de células amplificantes transitorias, también llamadas células progenitoras que ya están determinadas con una vía de diferenciación tisular específica. Las células amplificantes son llamadas así porque aumentan el efecto de división de las células troncales al multiplicar por dos las divisiones
6. Son células con muy baja actividad mitótica que permanecen quiescentes, sin sufrir división celular hasta que son necesitadas
7. Residen en *locus* histológicos propios llamados nichos, donde están en estrecho contacto con células específicas y con la membrana basal. Estos nichos facilitan su preservación en un estado quiescente hasta que son activadas. Las células que rodean las células troncales son las responsables de mandar señales a las mismas. Estas señales modulan la activación o la permanencia en un estado quiescente de las células troncales.

Las células troncales no forman un conjunto homogéneo de células, sino que son células distintas que van cambiando dinámicamente en el tiempo, pasando de un estadio a otro sin solución de continuidad, en un continuum. Al evolucionar van perdiendo capacidades de diferenciación. De acuerdo con esta evolución, las células troncales se distinguen unas de otras por su potencialidad de diferenciación en diferentes líneas celulares. Las más primitivas muestran la máxima capacidad de diferenciación, que van perdiendo hasta llegar a las células progenitoras, que tendrían su capacidad de diferenciación limitada a una sola línea celular. Ciñéndonos a este criterio tendríamos los siguientes tipos de células troncales^{35, 48} (figura 7):

1. Células troncales embrionarias procedentes del cigoto, que son totipotentes u omnipotentes, pudiendo dar lugar a todas las líneas celulares embrionarias y extraembrionarias (placenta).
2. Células troncales embrionarias procedentes de la masa celular interna del blastocisto, que serían pluripotentes, es decir, que podrían dar lugar a las líneas celulares de los tres tejidos embrionarios: endodermo, mesodermo y ectodermo, pero no a los tejidos extraembrionarios. Estas células troncales tendrían el máximo potencial terapéutico.
3. Células troncales somáticas procedentes del feto o del adulto, que se consideran multipotentes, ya que poseen una capacidad de diferenciación limitada a varias líneas celulares propias del tejido donde residen, al que regeneran. Este tipo de células troncales

está comprometido dentro de una línea celular concreta. Se pueden aislar de cualquier tipo de tejido, incluyendo el aparato respiratorio, y son conocidas como células troncales residentes. Tanto su número como su capacidad de autorrenovación disminuyen con la edad del individuo, perdiendo eficacia su utilización en la terapia celular. Tienen una eficacia terapéutica menor que las células troncales embrionarias, pero por contra su uso no plantea controversias éticas. Por eso, al carecer de esos inconvenientes, son las células troncales más utilizadas en la terapia celular y en la ingeniería tisular.

4. Células progenitoras somáticas unipotentes, células troncales que se diferencian sólo en una única línea celular, como por ejemplo los queratinocitos.

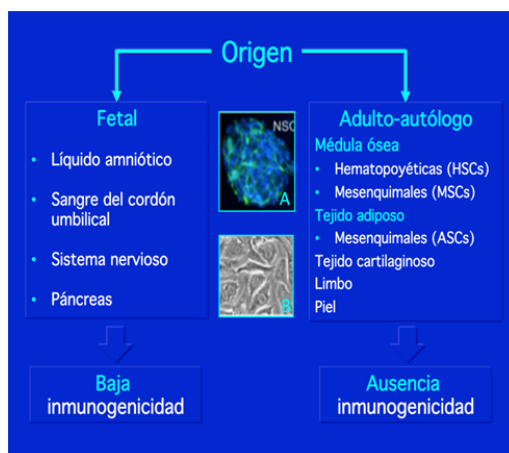
Figura 7.- Tipos de células troncales por su potencialidad



Sin embargo, esta clasificación de las células troncales de acuerdo a su potencialidad en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes, ha perdido fuerza, es decir, se ha hecho más imprecisa desde que Takahashi y Yamanaka ⁵⁰ demostraron que las células somáticas adultas podían ser reprogramadas, retornando a su estado pluripotente embrionario por medio de la adición de genes. Dicho descubrimiento les valió el Premio Nobel en el año 2012. A estas células troncales derivadas de células somáticas adultas se las llamó células troncales inducidas, asignándoles el nombre de iPS (*Inducted Pluripotent Cells*). Estas células tienen las mismas características que las células troncales embrionarias. Las células troncales iPS son pluripotentes y, al mismo tiempo, su uso terapéutico no supone conflictos éticos. Por contra, tienen como inconveniente que pueden presentar alteraciones genómicas, que den origen a teratomas. Estas alteraciones del genoma son producidas por los vectores vitales empleados para la inserción de los genes, que les dan su carácter troncal embrionario³⁵.

Otra forma de clasificar las células troncales es por su procedencia: de origen embrionario o de origen somático (figura 8)

Figura 8.- Fuentes de células troncales somáticas



A. Células troncales mesenquimales del adulto diferenciadas para formar cartílago. B. Células troncales fetales del sistema nervioso. Modificado de Prasongchean et al. 2012.⁵³

El origen de las células troncales nos lleva a plantear una cuestión importante a la hora de planificar un tratamiento con medicina regenerativa: ¿Cuál es la célula troncal más adecuada para llevar a cabo una terapia celular o una ingeniería tisular? Hay varias características de las células troncales que nos pueden ayudar a contestar a esta pregunta. Si comenzamos analizando las células troncales embrionarias, vemos que poseen el mayor poder de duplicación de forma indefinida junto con gran capacidad de diferenciación, son en teoría las que poseen la potencia, mas grande. Esto las convertiría en las células ideales para la terapia regenerativa. Sin embargo tienen varios inconvenientes, el primero es su forma de obtención. Así es, las células troncales embrionarias se pueden extraer de embriones excedentes de las técnicas de fecundación *in vitro*, o de los embriones creados por clonación con fines terapéuticos. En los dos casos es necesario destruir el embrión, esto plantea importantes objeciones éticas, que han llevado a distintas resoluciones jurídicas en los diferentes países. Dependiendo de esas consideraciones éticas y religiosas, en cada nación se han implantado legislaciones, que en unos casos permite la investigación con células troncales embrionarias y en otros la prohíbe o limita en gran medida. En España esta permitida su utilización consiguiendo previamente la autorización de la AEMPS.

La inmunogenicidad no es un problema porque es baja o nula⁵¹. El que si es un inconveniente para su empleo en la clínica es que pueden ser inductoras de tumores⁵².

Las células troncales embrionarias mientras permanecen indiferenciadas tienen un perfil inmunogénico bajo⁵¹, pero su principal inconveniente es que son inductoras de tumoraciones⁵², por lo que su empleo presenta problemas relevantes de seguridad. Descartadas las células embrionarias, nos quedan las células troncales somáticas adultas, que no tienen conflictos éticos ni están implicadas en el desarrollo de tumores. Se ha comprobado que es posible identificar células troncales en todos los tejidos, pero varían en su número, accesibilidad y poseen diferente potencia. Por ejemplo, el acceso a las células troncales neuronales es muy limitado y su obtención implicaría siempre la ruptura del tejido nervioso. Por contraste las CTM son muy accesibles, se pueden aislar de todos los tejidos humanos, pueden ser cultivadas en gran número y son capaces de experimentar diferenciación a diferentes líneas celulares, aunque este aspecto todavía necesita de desarrollo. Por ende en todos los ensayos clínicos en fase I en los que se han usado las CTM para reparar un espectro muy amplio de tejidos, no se ha informado de efectos adversos significativos, indicando que su elección para diseñar terapias celulares es adecuada⁵³. Entre las dos fuentes más frecuentemente usadas para extraer MSCs se encuentran la médula ósea y el tejido adiposo abdominal.

2. Células troncales mesenquimales

Las CTM son muy usadas en la terapia celular y en la ingeniería tisular por sus propiedades: fácil obtención y capacidad multipotente de diferenciación en adipocitos, condrocitos, osteoblastos, células endoteliales y células de estirpe neural, además de por sus capacidades inmunomoduladoras y de secreción paracrina. De hecho han sido y son las células troncales con más amplia aplicación en trabajos tanto preclínicos, en animales de experimentación, como en ensayos clínicos⁵⁴. El nombre de mesenquimales se empezó a emplear para distinguirlas de las células troncales hematopoyéticas, ambas residentes en la médula ósea, ya que forman el estroma de la médula ósea.

La primera sugerencia de la existencia de CTM en la médula ósea fue propuesta por el patólogo alemán Cohnheim en 1867⁵⁵. Este estaba llevando a cabo un estudio del proceso de cicatrización en las heridas, cuando observó que muchas de las células que participaban en la

reparación procedían del torrente circulatorio. Según su hipótesis las células con similitud a los fibroblastos migrarían desde la médula ósea a las zonas de daño tisular para allí tomar parte en la regeneración del tejido⁵⁶. Más tarde Friedenstein et al⁵⁷ consiguió aislarlas de la médula ósea de los ratones, caracterizarlas y diferenciarlas a osteocitos, denominándolas precursores celulares osteogénicos. Constató que en la médula ósea existían dos poblaciones de células troncales, las células troncales hematopoyéticas y otra fracción celular que mostraba adherencia al plástico. Este investigador y posteriormente otros demostraron la capacidad de diferenciación multipotente de estas células en al menos tres líneas celulares diferentes: adipocitos, condrocitos y osteoblastos⁵⁸. Veinte años más tarde fue Caplan⁵⁹ el que propuso denominar a estas células células troncales mesenquimales, acuñando el concepto por el que ahora se las conoce.

Su definición se apoya únicamente en sus propiedades identificadas en cultivo *in vitro*. No poseen marcadores específicos. La sociedad Internacional de Terapia Celular en el año 2006⁶⁰ propuso unos criterios mínimos para identificar a estas células troncales: deben de ser adherentes al plástico, principal característica cuando se mantienen en condiciones estándar de cultivo; deben expresar los marcadores, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y al mismo tiempo no expresar CD45, CD34, CD4, CD 11b, CD79 α , CD19 y moléculas de superficie del complejo HLA-DR y tienen que tener la capacidad de diferenciarse al menos en osteoblastos, adipocitos y condroblastos. Estos criterios facilitan su caracterización *in vitro* pero no su identificación *in vivo*.

Las CTM son una población celular muy infrecuente, pero con una distribución muy extensa⁵⁸ entre distintos tejidos. Así, en las diferentes especies, incluyendo los humanos y las ratas, su aislamiento se hace tanto en la médula ósea como en la mayoría de los tejidos conectivos del cuerpo. Entre los tejidos de donde se ha obtenido están, los tejidos fetales⁶¹, la sangre del cordón umbilical⁶², la gelatina de Wharton del cordón umbilical⁶³, el líquido amniótico⁶⁴, la sangre periférica⁶⁵, el hueso compacto⁶⁶, el periostio⁶⁷, la membrana sinovial⁶⁸, el líquido sinovial⁶⁹, el cartílago articular⁷⁰ y el tejido adiposo⁷¹. Las CTM provenientes de diferentes tejidos son heterogéneas⁵⁸. Esta variabilidad entre las distintas fuentes de CTM dificulta y pone límites a la estandarización de los tratamientos con terapia celular y a la comparación de los resultados clínicos⁵⁸. Hay un acúmulo de pruebas que indican que esa heterogeneidad en las poblaciones de las CTM se traduce en variaciones de su potencia⁵⁸.

Su identidad dentro de estos tejidos no esta clara. Los nichos donde residen estas células troncales no están bien definidos. Sin embargo, evidencias cada vez más consistentes señalan que los pericitos pueden ser el origen de las CTM cultivadas y caracterizadas *in vitro*. En los estudios realizados por Crisan et al⁷² se observa que estas células expresan nativamente antes de cultivarlas los mismos marcadores de superficie, CD44, CD73, CD90 y CD105, que las CTM. Al igual que estas, se adhieren al plástico y son capaces de experimentar diferenciación a las tres líneas celulares: osteoblastos, adipocitos y condroblastos. Por tanto comparten con las CTM los mismos rasgos cardinales que las definen. Si asumimos que las CTM podrían derivar de los pericitos, esto nos facilitaría explicar porque estas células pueden ser aisladas prácticamente de cualquier tejido del cuerpo humano.

Esta situación perivascular de las CTM nos ayuda a entender su papel en la homeostasis y los procesos regenerativos del cuerpo. Los hechos serían así, cuando se produce un daño local los pericitos, que se sitúan en la membrana basal del vaso lesionado, se activan cambiando su fenotipo en CTM. Sea el origen de las CTM el pericitito o no, lo que si es cierto que una vez activadas las CTM van a actuar modulando la respuesta inflamatoria, convirtiéndose en la primera línea de defensa en contra de las reacciones autoinmunes y favoreciendo la regeneración. La regeneración la estimulan por medio de la secreción de múltiples factores tróficos. Estos son factores de crecimiento, citoquinas, y cimoquinas, que estimulan la angiogenesis, estabilizan la pared de los vasos al adherirse a sus paredes, inhiben la apoptosis inducida por isquemia, frenan la formación de cicatrices y estimulan las mitosis de las células progenitoras locales⁷³. El efecto global de CTM es ayudar a la capacidad de regeneración intrínseca que poseen todos los tejidos frenando el deposito de colágeno, es decir la formación de cicatriz. Por tanto las CTM funcionan *in vivo* como células terapéuticas (*Medicinal Signaling Cells*)⁷³ para reparar los tejidos que sufren daño mecánico o procesos inflamatorios. Esta acción anti-inflamatoria, que las constituye como la primera línea de defensa contra las reacciones crónicas autoinmunes, es tan sobresaliente, que las ha llevado también a ser apodadas células guardianas de la inflamación⁷³.

La aplicación de estas células ha resultado beneficiosa en multitud de modelos experimentales en animales. Si nos centramos en la patología del tracto respiratorio, se ha empleado en modelos experimentales que van desde el daño pulmonar agudo, sepsis, asma, bronquiolitis obliterante, enfisema inducido por elastasa, daño por el humo de tabaco, fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, daño por isquemia-reperfusión⁷⁴.

Por las mismas razones las células troncales mesenquiales se han convertido en la primera herramienta tanto en ensayos de terapia celular avanzada como en ingeniería tisular⁷³. Si usamos otra vez el motor de búsqueda de la base de datos online americana ClinicalTrials.gov, e introducimos, esta vez las palabras *mesenchymal stem cell* en lugar de *stem cell* descubriremos que en la actualidad, se están llevando adelante mas de 500 ensayos clínicos, que tienen como objetivo evaluar la acción terapéutica de las CTM en diferentes procesos patológicos.

Además de su acción trófica e inmunomoduladora las CTM son multipotentes con capacidad de diferenciación en varios tipos de células mesenquiales, esto ha permitido que sean escogidas como los actores principales en los procesos de ingeniería tisular para la fabricación de múltiples tejidos conectivos: tráquea, hueso, cartílago, músculo, estroma de la medula ósea, tendones, ligamentos, tejido adiposo, etc⁷³.

3. Cicatrización y células mesenquiales

La inflamación es una respuesta protectora inespecífica, siempre es la misma, independientemente de la etiología del daño causal, que permite en un corto espacio de tiempo, mucho más reducido, que lo que implicaría la regeneración del tejido, restituir la integridad del mismo. Además de restituir rápidamente la barrera externa frente al medio, la inflamación hace frente a dos hechos igual de nocivos para la supervivencia del individuo, los restos necróticos y los microorganismos. Esa velocidad en la reparación y en llevar a delante la limpieza y la defensa frente a la infección, lo es a costa del depósito de colágeno, es decir de la formación de una cicatriz con la consabida pérdida de función.

El modelo de reparación más conocido es el de las heridas de la piel. Las heridas superficiales de la piel cicatrizan por regeneración de la epidermis sin inflamación asociada, pero cuando la herida es más profunda y se daña la matriz extracelular, la inflamación es indefectible. La reparación de la matriz extracelular sólo se puede realizar por la respuesta de inflamación-fibrosis. El proceso que se dispara es dinámico y esta altamente regulado por mecanismos celulares, humores y moleculares que se desencadenan inmediatamente de producirse la herida

y que en su última fase de remodelación pueden durar meses, incluso años⁷⁵. Este complejo proceso, aun no completamente comprendido, implica la sucesión coordinada de una serie de diferentes eventos, que van desde el sangrado, la hemostasia con la formación del coágulo, la liberación de factores inflamatorios, inflamación aguda, migración celular, proliferación, diferenciación, angiogenesis, re-epitelización, síntesis y remodelado de la matriz extracelular. Todo este proceso se divide para su comprensión de forma arbitraria según los autores en distintas fases, entre tres y cinco. La clasificación más común distingue tres fases que se solapan unas con otras, fase inflamatoria, proliferativa y de remodelación.

En todo el proceso inflamatorio-cicatrización las MSCs juegan un papel central, tanto reclutando otras células, como por diferenciación celular de si mismas, como por efectos paracinos, a través de señales celulares, secreción de factores de crecimiento, citoquinas, y cimoquinas. Ellas son las encargadas de modular y coordinar la respuesta inflamatoria e inmunológica, favoreciendo la regeneración frente a la reparación por inflamación-fibrosis. Las MSCs están implicadas en todas las fases de la curación de las heridas. Un mecanismo de acción muy importante de actuación de las MSCs es atenuando la respuesta inflamatoria, disminuyen la secreción de citoquinas proinflamatorias, del factor de necrosis tumoral (TNF- α) y del interferon- γ , mientras que al mismo tiempo aumentan la producción de citoquinas anti-inflamatorias, interleuquina-10 e IL-4. Todos estos efectos antiinflamatorios de las MSCs las hace especialmente beneficiosas en el tratamiento de las heridas crónicas, ya que pueden reiniciar la cicatrización en heridas crónificadas haciéndolas avanzar hacia una curación definitiva. Existen muchísimos datos que apoyan el carácter anti-inflamatorio e inmunomodulador en la curación de las heridas^{76, 77}.

Recientemente se ha constatado que los MSCs poseen actividad antimicrobiana, que resulta crítica para la lucha contra la infección. Su acción antimicrobiana la ejercen mediante un mecanismo directo con la secreción de factores antimicrobianos como el LL-37, y también indirecto por la secreción de factores inmunomoduladores que regulan la fagocitosis y la muerte directa de los gérmenes por las células inmunes.

Entre los mediadores por los que las MSCs estimulan la reparación se encuentran factores de crecimiento, citoquinas, quimocinas, específicamente VEGF, PDGF, bFGF, EGF, factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF) y factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF)⁷⁸.

Muchas células, epiteliales, endoteliales, queratinocitos y fibroblastos responden a las señales paracrinas de las MSCs. Muchas de las respuestas celulares, que influyen en su supervivencia, proliferación, migración y expresión genética son reguladas por las MSCs. Los mecanismos moleculares son complejos, pero un análisis detallado se puede encontrar en varias revisiones⁷⁹⁻⁸¹.

Si aceptamos los datos que nos indican que los pericitos son el origen de las MSCs, vemos que esta situación en el organismo es muy apropiada para cumplir su función de modulador de la inflamación, reparadoras del tejido lesionado y promotoras de la regeneración que tienen las MSCs. Sea cual sea el punto anatómico lesionado en cuanto este interese la pared de un vaso se activaran los pericitos dando lugar a las MSCs, por tanto se activa su genotipo al mismo tiempo que se inicia la inflamación pudiendo ejercer su función de control. Por si este mecanismo no fuera suficiente esta comprobado que las MSCs migran a los sitios lesionados en respuesta a señales quimiotacticas⁷⁶.

Además de esta acción endógena de las MSCs existe evidencia muy importante, proveniente de muchos estudios tanto experimentales como clínicos, que la administración exógena de MSCs se sigue de efectos beneficiosos en la reparación de las heridas⁸².

Podemos concluir que en el complejo proceso de curación de las heridas las MSCs juegan un papel fundamental mediando en cada una de las fases del proceso, inflamatoria, proliferativa, y de remodelación para conseguir una cicatrización adecuada.

4. Técnica de obtención y procesado de las células troncales mesenquimales de origen adiposo

Un problema común a las células troncales es su identificación y aislamiento, ya que su población en relación a las células que componen el resto del tejido es escasa. Las células troncales componen un porcentaje muy pequeño de los tejidos adultos. Así por ejemplo, en la mucosa del conducto intestinal se encuentran aproximadamente unas diez células troncales, situadas en el fondo de la cripta intestinal, de un total de aproximadamente 300 células que componen la cripta. En el músculo esquelético las células troncales satélites comprenden aproximadamente un 5% de todos los núcleos celulares. En la médula las células troncales

hematopoyéticas son aún mas infrecuentes, encontrándose una célula troncal entre 10.000 células. Las células troncales mesenquimales son igual de infrecuentes, 1 en 10.000. Su número varía con la edad del sujeto, mientras que los recién nacidos tiene la densidad, que hemos señalado más arriba, de 1/10.000 células troncales mesenquimales por células de la médula ósea, en un adolescente esta proporción baja a 1/100.000, la proporción continua descendiendo según envejece el sujeto pasando de 1/250.000 en la década de los 30, a 1/400.00 en la década de los cincuenta, a 1/2.000.000 en los individuos mayores de 80 años. Esta reducción de las células troncales mesenquimales esta en correlación con la disminución de la densidad vascular que se da con el envejecimiento y resalta la estrecha relación que tienen las células troncales mesenquimales con los vasos.

La técnica de obtención de las CTM procedentes del tejido adiposo fue establecido por Zuk en el 2001⁸³. El proceso consiste en la realización de una liposucción de la grasa del cuerpo situada en el abdomen. Si esa zona no es suficiente para extraer un volumen de grasa de 150 ml o mas se pueden escoger también los flancos, los muslos, los glúteos y la cara interna de las rodillas. El lipoaspirado así obtenido se somete a un proceso de digestión enzimática con collagenasa

5. Técnicas de aplicación en el tejido diana

Todavía no se conoce cual es la forma, en que se tienen que aplicar las MSCs para lograr el mejor efecto terapéutico. Se han empleado distintos métodos, que fundamentalmente se pueden reducir a dos: inyección sistémica intravascular, e inyección local. La inyección sistémica en el torrente circulatorio se apoya en la propiedad que tienen las células troncales mesenquimales de migrar y localizarse en los tejidos dañados o donde hay procesos inflamatorios. Después de la infusión sintética de MSCs ha sido posible recuperarlas en múltiples órganos como el pulmón, el hígado, el riñón, o el bazo. Esta distribución no ha sido la única, también se han encontrado en lugares específicos, como sitios donde hay procesos inflamatorios, tumores, lechos que han sufrido daño tisular o tejidos que contienen MSCs como la médula ósea⁵⁸. Sin embargo la administración sistémica de las MSCs tiene el inconveniente de que las MSC son frágiles y quedan eliminadas casi inmediatamente de la circulación al quedar atrapadas en el pulmón⁷³. Barbash et al⁸⁴ encontraron esta dificultad cuando al administrar sistémicamente

por vía intravenosa las BM-MSCs en ratas con un infarto de corazón, la mayoría de ellas quedaron atrapadas en el pulmón sin llegar a alcanzar el miocardio. Para evitar el filtro del pulmón administraron las BM-MSCs directamente en el ventrículo mejorando su migración y colonización del lecho de miocardio infartado. La localización de la MSCs en los lugares donde se ha producido un daño tisular esta mediada por quimiocinas. Una estas moléculas es la SDF-1, que es secretada por las células del miocardio de los ratones cuando sufren infarto. Su liberación facilita la colonización de la zona infartada por MSCs que dan protección al corazón frente a posibles futuros eventos⁸⁵. Mientras que la localización preferente de las MSCs en el pulmón es una desventaja cuando se quieren tratar otros órganos esta cualidad se convierte en una ventaja para diseñar herramientas terapéuticas con MSCs para tratar enfermedades pulmonares. Para evitar el filtro pulmonar y que las MSCs lleguen al tejido diana se han explorado muchas formas de liberación local, se han inyectado por vía intramuscular, intraarticular en el líquido sinovial, intratraqueal en la vía aérea, intacardiaco en la cámara ventricular, infusión arterial intracoronaria, inyección transendocardica, inyección tranepicardica durante la cirugía e intratecal⁸⁶. Obviamente encontrar una vía para la aplicación local a vísceras intracorporales es difícil e implica siempre algún procedimiento invasivo. Para la aplicación tópica de las MSCs se han usado diferentes métodos que van desde la inyección directa en los bordes o proximidades de la herida, a su pulverización mediante un adhesivo de fibrina. En concreto el polímero de fibrina ha demostrado ser un vehículo de transporte de las MSCs al tejido diana muy versátil con aplicaciones muy extendidas y diferentes para la regeneración de de tejido adiposo, hueso, tejido cardiaco, tejido ocular, piel, tendones y ligamentos⁸⁷.

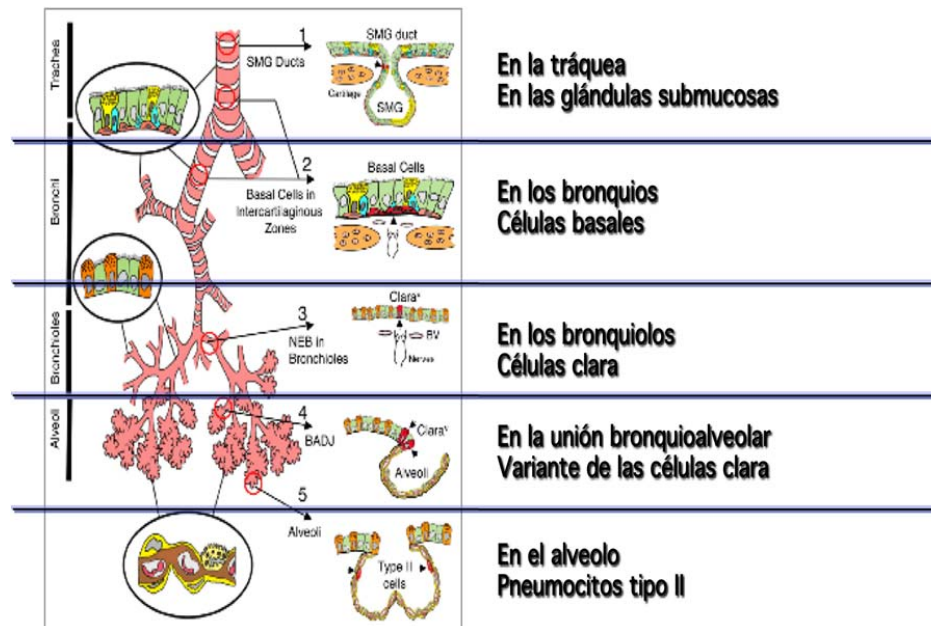
D. Terapia celular e ingeniería tisular en el pulmón y el árbol tráqueo-bronquial

Las enfermedades pulmonares son un problema de salud a nivel mundial. Muchas de estas enfermedades, como el EPOC y el enfisema, son crónicas y carecen de terapias efectivas, siendo el tratamiento sintomático. El trasplante de pulmón no es la solución para el cúmulo de enfermedades degenerativas pulmonares. Las razones son la carencia de órganos donantes y una supervivencia limitada a 5-6 años, debido a las enfermedades relacionadas con el trasplante

como la bronquitis obliterante⁸⁸. Existe, por tanto, una necesidad urgente de encontrar terapias alternativas que puedan dar respuesta a ese problema de salud. La terapia regenerativa se ha convertido en la gran esperanza de encontrar una nueva solución tecnológica, que permita regenerar el pulmón y árbol traqueo-bronquial⁸⁹.

Hasta hace pocos años se desconocía la existencia de células troncales capaces de llevar a cabo la regeneración del pulmón. Trabajos experimentales en pulmones de ratón llevaron a la identificación de cinco nichos donde residían células que eran capaces de regenerar el epitelio pulmonar del ratón después de someterlo a un daño importante⁹⁰. Los nichos identificados fueron: en la tráquea las glándulas submucosas, en los bronquios las células basales, en los bronquiolos las células clara, en la unión bronquioalveolar una variante de las células clara, en el alveolo los pneumocitos tipo II (figura 9) .

Figura 9.- Nichos de las células troncales progenitoras en el ratón



Modificado de Liu et al.⁹¹

Más tarde Kajstura et al.⁹² lograron identificar las células troncales en pulmones de donantes humanos. Eran células autorrenovables, clonogénicas y multipotentes. Cuando fueron inyectadas en ratones de experimentación, en los que sus pulmones habían sido dañados, estas células fueron capaces de formar tejido pulmonar humano quimérico en el ratón.

Sin embargo, la capacidad de reparación de estas células troncales endógenas residentes en el pulmón declina con el paso del tiempo, hasta agotarse. Existe por tanto una necesidad de encontrar células troncales exógenas. Se necesita para poder desarrollar terapias celulares y de ingeniería tisular una fuente de células troncales indiferenciadas, que tengan la capacidad de regenerar células provenientes de diferentes líneas celulares⁸⁸.

Las CTM, cuyas propiedades hemos comentado, se han convertido en una de las protagonistas para diseñar las terapias celulares.

Si nos centramos en CTM en la patología del tracto respiratorio, se han empleado en modelos experimentales que van desde el daño pulmonar agudo, sepsis, asma,

bronquiolitis obliterante, enfisema inducido por elastasa, daño por el humo de tabaco, fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, daño por isquemia-reperfusión⁷⁴.

Ya dentro de los ensayos clínicos la terapia celular está siendo estudiada en muchos procesos patológicos, entre ellos encontramos las siguientes enfermedades: la EPOC, el daño pulmonar agudo, la fibrosis pulmonar, la fibrosis quística, el asma y la hipertensión pulmonar. Estos trabajos están en su fase preclínica o clínica inicial, sin que existan todavía resultados que demuestren su ventaja sobre las terapias ya establecidas³⁵.

Además de las enfermedades pulmonares, en donde se han centrado gran parte de los esfuerzos de la medicina regenerativa ha sido en la tráquea. Al igual que ocurría con el pulmón hay una necesidad de encontrar sustitutos completos de la tráquea y los bronquios principales. Esta necesidad surge de la imposibilidad de hacer resecciones traqueales con anastomosis termino-terminal cuando la longitud del segmento a resecar es superior al 50% de la longitud de la tráquea en los adultos y del 30% en los niños. Para poder abordar patologías que impliquen resecciones de una longitud superior de tráquea hay que recurrir al trasplante de tráquea. Nuevamente como en el trasplante de pulmón existe el rechazo inmunológico y la escasez de tráqueas donantes. Un gran esfuerzo se ha realizado en desarrollar una tráquea bioartificial por medio de ingeniería tisular.⁹³ Uno de los logros más sobresalientes en ingeniería tisular de la tráquea fue el logrado por Macchiarini et al. En una mujer con una broncomalacia terminal del bronquio principal izquierdo, secuela de una tuberculosis bronquial, llevaron a cabo una resección completa del bronquio izquierdo. Este se sustituyó con una bioprótesis desarrollada con ingeniería tisular. Se escogió un segmento de tráquea procedente de un cadáver. Se le sometió a un proceso de descelularización para eliminar los antígenos de histocompatibilidad. En una segunda fase la tráquea se celularizó en un biorreactor con dos líneas celulares, un epitelio respiratorio y células mesenquimales diferenciadas en condrocitos.

En el momento actual las CTM autólogas son las células troncales más empleadas en la ingeniería tisular laringo-traqueal⁸⁹. Las CTM procedentes del tejido adiposo también han sido escogidas para realizar ingeniería tisular traqueal. En un modelo experimental en ratas Suzuki et al.⁹⁴ encontraron que las CTM derivadas de la grasa aceleraron la neovascularización y la epitelización de la bioprótesis traqueal. El mismo grupo de investigación establecieron en otro experimentaron ratas que bioprótesis traqueales construidas con fibroblastos de origen gingival combinadas con CTM de origen adiposo tienen un efecto sinérgico que acelera la incorporación

de la bioprótesis en la tráquea⁹⁵. A pesar de todos los datos favorables a usar las CTM derivadas del tejido adiposo en la regeneración traqueal no hemos encontrado trabajos donde se aplique a la cicatrización traqueo-bronquial.

Cuando se comenzó este trabajo no existía experiencia en la aplicación de esta terapia celular e ingeniería tisular con CTM con origen adipogénico para los problemas de cicatrización del bronquio. Todavía hoy la experiencia es muy limitada.

E. Innovación en cirugía, diseño de nuevos procesos

La cirugía, a diferencia de la medicina, presenta una mayor dificultad de estudio, de análisis formal científico y está más ligada a una práctica empírica. En medicina cuando se quiere analizar el efecto terapéutico de un fármaco, es fácil realizarlo porque este se encuentra perfectamente caracterizado. Se conoce su perfil bioquímico, se conoce su farmacodinámica, su distribución, sus efectos adversos, su eficacia en las diferentes patologías, su dosis terapéutica, su dosis tóxica, por lo que es metodológicamente relativamente sencillo diseñar ensayos clínicos randomizados en los que el fármaco activo se compare con un placebo. El diseño se puede realizar ciego, de forma que el paciente ignore que fármaco está tomando el activo o el placebo, para evitar sesgos en su evaluación. Es más, se puede enmascarar tanto para el paciente como para el investigador mediante un estudio doble ciego.

Por contra, la cirugía ofrece muchas más dificultades para un análisis científico. ¿Cuál es la dosis de cirujano?. Mejor expresado, ¿cuál es el fármaco activo?: el cirujano, el equipo quirúrgico, incluyendo todos los profesionales (anestesista, instrumentista, enfermera circulante, celadores, anatomopatólogo, etc) que participan en una intervención quirúrgica. No se conoce, depende de múltiples factores, de la experiencia de cada uno de sus componentes, de su conocimiento mutuo, de su historial de trabajo en equipo, de los recursos que disponen, tanto humanos como materiales, del tiempo disponible.

Existe además una variable inherente a la cirugía que es la curva de aprendizaje. Cuanto más se practica mejor se hace, disminuyendo en el tiempo las complicaciones y el tiempo de ejecución, mejorando los resultados. Cuando se evalúan procesos quirúrgicos se plantea casi siempre un dilema, que se conoce como la ley de Buxton⁹⁶. Según esta ley, a la hora de analizar

un procedimiento quirúrgico, siempre se cae en una de estas dos fases: o es muy temprano para realizar una evaluación de la técnica quirúrgica porque esta se encuentra todavía en periodo de aprendizaje o ya está establecida. En el primer caso si se sometiera a juicio en la fase inicial, cuando la curva de aprendizaje no se ha concluido, los resultados serían infravalorados porque se achacarían a la técnica problemas que en realidad son de aprendizaje. En el segundo caso, cuando el procedimiento está ya plenamente aceptado, no sería justo incluir a los pacientes en un ensayo para establecer la efectividad de un procedimiento completamente aceptado y de eficacia probada.

Gran parte de la cirugía que se practica en la actualidad, exceptuando pocos casos, se basa sólo en casos clínicos aislados o en todo caso en series de casos analizados de forma retrospectiva. En la era de mayor predicamento de la medicina basada en la evidencia se puede decir, sin temor a equivocarse, que la cirugía cimienta su práctica en grados de evidencia muy bajos, VII o VIII de la escala de AATM (*Agència d'Avaluació de Tecnologia Mèdica de la Generalitat de Catalunya*)⁹⁷. Este es el caso de la cirugía torácica, en la que la mayor parte de su práctica descansa sobre evidencias muy débiles. Así es, toda la cirugía oncológica torácica se apoya en un solo caso exitoso publicado por Evarts Graham en 1933⁹⁸.

Si es difícil evaluar los procedimientos quirúrgicos establecidos, aún más complejo es establecer el flujo de acciones que pueden llevar al diseño de una nueva técnica quirúrgica. Efectivamente, el desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas no está científicamente desarrollado. Se hizo una búsqueda exhaustiva en los buscadores *PubMed*, *Google Académico*, *Google Patentes*, *Google Netting the Evidence*, y el metabuscador *Dogpile* de diferentes combinaciones de las palabras: *feasibility*, *flow chart*, *surgical procedures*, *novel* e *innovation in surgery* sin encontrarse modelos que pudiéramos aplicar a nuestro estudio. Si encontramos la elaboración de escalas de factibilidad para evaluar las habilidades quirúrgicas adquiridas por los residentes o establecer programas de entrenamiento en tareas quirúrgicas.

Otro factor, que complica aún más la búsqueda de un sistema de evaluación adecuado que podamos asociar al acto quirúrgico, es el uso de fármacos durante su desarrollo y si consideramos la terapia celular, la cual se basa en un fármaco vivo que puede variar su comportamiento según el entorno o el estado de estas, se complica enormemente la generación de un sistema de validación adecuado del tratamiento.

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Un problema constante en la práctica quirúrgica, origen de graves complicaciones para los pacientes, es la cicatrización insuficiente de la herida quirúrgica. Las consecuencias de la pobre cicatrización pueden ser de dos tipos: la dehiscencia de la herida y la formación de fistulas. En este trabajo nos centraremos en las fistulas, por su complejidad e impacto en el paciente.

Las fistulas suponen una comunicación patológica entre un órgano hueco, vaso o estructura tubular y otro de la misma naturaleza o con una cavidad patológica o con la piel. Sus consecuencias dependen de las vísceras implicadas. Las fistulas pueden ser congénitas o adquiridas tras un procedimiento quirúrgico o terapéutico, que son a las que nos ajustaremos en este estudio.

Las fistulas postquirúrgicas se manifiestan en el postoperatorio tardío, entre el séptimo y décimo cuarto día de la intervención, y suponen un importante efecto adverso de la cirugía. Las principales consecuencias para el paciente son: necesidad de nuevos procedimientos quirúrgicos abiertos o cerrados, una prolongación de la estancia hospitalaria, un aumento importante de la morbi-mortalidad y un deterioro de su calidad de vida.

Las fistulas postquirúrgicas más frecuentes en la cirugía torácica son las del muñón bronquial, ya sea de segmentectomía, de lobectomía o de neumonectomía, en las cuales se establece una comunicación entre la vía aérea y la cavidad pleural. Las consecuencias fisiopatológicas de esas fistulas son de dos tipos y se dan en dos sentidos: en primer lugar se produce la salida de aire y secreciones traqueobronquiales a la cavidad pleural llevando a la formación de un hidroneumotórax y empiema; en segundo lugar, en sentido contrario, el paso desde la cavidad pleural al pulmón del contenido pleural, normalmente seroso, causará una neumonía aspirativa, que habitualmente es mortal.

Otras fistulas menos frecuentes, pero más graves y complejas en su manejo, son las fistulas esofagotraqueales o esófagobronquiales. Su efecto más deletéreo es el paso del contenido digestivo a la vía aérea, donde causa bronconeumonía y daño pulmonar. A ese problema hay que añadir que la alimentación oral se ve imposibilitada, ya que se sigue de crisis tusígenas y disnea.

El problema de las fistulas broncopleurales es especialmente acuciante en la cirugía torácica, donde las fistulas de los muñones bronquiales siguen dándose en un 4,4-22%^{2, 4} de los

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

pacientes sometidos a resecciones anatómicas. Los factores implicados en su desarrollo son múltiples ^{3, 5}, pero el más importante de todos, con mucho, es la lateralidad, ya que es un problema casi único de la neumonectomía de lado derecho^{2, 7-9}. Su incidencia ha continuado bajando sobre todo por la reducción en el número de neumonectomías realizadas, 0,98% en el registro de la base de datos francesa *Epithor*⁶. Sin embargo, su incidencia ha crecido de nuevo por la introducción de tratamientos multidisciplinarios con quimioterapia y radioterapia ^{99, 100}. Son terapias neoadyuvantes o adyuvantes a la cirugía, para mejorar los resultados oncológicos ¹⁰¹. Tanto la quimioterapia como la radioterapia interfieren con los mecanismos de cicatrización tisular, incrementando de esta forma la incidencia de fístulas.

Para el paciente es una complicación muy grave, de carácter vital, asociada a una alta morbilidad y a una mortalidad entre el 12,5-71,2%^{6, 11, 102, 103}. La mortalidad se sitúa en España en un 5,4-13,3%^{2, 3}. La aproximación terapéutica de estas fístulas es muy difícil, implicando un gran desafío para el cirujano torácico, que ha venido abordándolo desde muchas y diferentes técnicas quirúrgicas^{103, 104}, sin que ninguna de ellas haya prevalecido. Por tanto, en la actualidad no existe una solución bien definida¹⁰³.

Las fístulas esófago-traqueales, mucho más raras que las del muñón bronquial, han visto decrecer su incidencia como consecuencia de los mejores cuidados de los pacientes críticos durante la ventilación mecánica prolongada, pero siguen sin tener una resolución sencilla.

La aproximación inicial a las fístulas está dirigida a evitar las complicaciones mortales y controlar los efectos secundarios de su formación.

El tratamiento clásico de las fístulas de muñón de resección es la toracostomía abierta, en la cual se marsupializa la cavidad pleural al exterior mediante la resección de varios arcos costales y sutura de la piel con la pleura parietal, permitiendo las curas diarias de la fístula. El paciente tiene que mantener la toracostomía abierta durante más de un año. Cuando las fístulas afectan a las broncoplastias o las resecciones traqueales revisten todavía mayor gravedad y suelen llevar al fallecimiento del paciente por complicaciones de la misma. Así, muchos fallecen con una hemoptisis masiva al establecerse una fístula vascular.

El tratamiento inicial de las fístulas esófago-traqueales es todavía más complejo e implica desconexión por medio de diferentes técnicas del tubo digestivo de la vía respiratoria, para evitar el daño pulmonar por aspiración. La corrección definitiva requiere de reintervenciones, de

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

cirugías complejas, graves, con transposición de tejidos, con morbi-mortalidad elevada y secuelas considerables. Por todo ello aún no está bien definida la estrategia más adecuada y efectiva para abordar esta problemática.

El marco de opciones terapéuticas para la corrección de las fistulas se ha visto modificado recientemente con la introducción de la terapia celular y de la ingeniería tisular. Aunque no existe experiencia en la utilización de las técnicas de la medicina regenerativa en las fistulas torácicas, si hay resultados muy positivos de su aplicación en fistulas del aparato genital femenino¹⁰⁵ y del tubo digestivo^{106, 107}. Los resultados de estos trabajos pioneros y las potencialidades de la medicina regenerativa nos ha llevado a preguntarnos ¿puede la terapia celular y la ingeniería tisular modificar el curso de las fistulas torácicas?

La medicina regenerativa propone usar las células troncales adultas para promover e inducir en el paciente los propios mecanismos de curación que permitan la reparación de los tejidos, logrando así restaurar sus funciones *in situ*.

El objetivo de nuestra investigación es conocer en que forma las células troncales adultas podrían ayudar a la cicatrización de las fistulas postquirúrgicas y de las de origen iatrogénico, ya sean traqueales o bronquiales, cuando están bien consolidadas, han fracasado las técnicas habituales o se han cronificado.

Para mejorar la reparación tisular de estas fistulas hemos escogido las células troncales mesenquimales procedentes de la fracción vásculo-estromal del tejido adiposo como la fuente más disponible, por su sencilla obtención a través de técnicas de lipoaspirado, que pueden hacerse con anestesia local y sedación de forma ambulatoria por los especialistas de cirugía plástica.

Las células troncales adultas mesenquimales (MSCs) son muy adecuadas para nuestro propósito, ya que son células troncales multipotentes o pluripotentes³⁵, con capacidad de diferenciarse en tejidos específicos como el hueso, cartílagos, músculos, tendones, ligamentos y otros tejidos conectivos, muy importantes en la cirugía¹⁰⁸. Asimismo, existen múltiples trabajos^{109, 110} que encuentran que las células troncales procedentes del mesénquima están implicadas en el proceso de cicatrización. Está constatado que las células troncales mesenquimales ejercen una acción muy importante en la regeneración y reparación por cicatrización de los tejidos. No está tan claro de donde proceden estas células, algunos investigadores piensan que las células

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

troncales mesenquimales proceden de la activación de los pericitos por el daño tisular. Como los pericitos están presentes en la pared de todos los vasos, cualquier daño de la pared de los mismos llevaría a su activación en MSCs, garantizando de esa forma su participación siempre en los procesos de reparación por inflamación-cicatrización.

La acción reparadora de las MSCs en los tejidos es llevado a cabo por dos mecanismos, diferenciándose hacia las células de los tejidos dañados y secretando un amplio espectro de macromoléculas bioactivas, factores de crecimiento, citoquinas y factores paracrinos, que son angiogénicos e inmunomoduladores. De esa forma favorecen y armonizan el proceso de cicatrización^{109, 111}. Este segundo mecanismo de acción de las MSCs es el principal y se conoce como efecto trófico. Este efecto trófico es especialmente importante cuando los mecanismos de reparación se han visto dañados por la aplicación de terapias como la radioterapia o la quimioterapia, o por unos cuidados críticos prolongados.

En ese sentido el empleo de células troncales mesenquimales en la fístula no es más que un paso lógico, en el que se quiere aportar células pluripotenciales que lleven a cabo la cicatrización-regeneración por un procedimiento más sencillo y menos cruento para el paciente que las plastias, con movilización de tejidos. De esa forma se evitaría una cirugía extensa, que muchos de estos pacientes no están en condiciones de soportar.

Uno de los problemas iniciales que se plantea en la medicina regenerativa es como vehicular y liberar las células troncales en el tejido diana, en este caso en el seno de la fístula. Para ello se han recurrido tanto a técnicas de terapia celular como de ingeniería tisular. Un punto esencial que tenía que resolverse era como se podían aplicar esas técnicas. En ese sentido se ha pensado que las vías naturales, la vía respiratoria y el aparato digestivo, explorables con técnicas endoscópicas mediante broncoscopios y gastroscopios, serían los conductos ideales para tener acceso directo a las fístulas y permitir así la aplicación de las terapias celulares y de ingeniería tisular. El disponer de procedimientos mínimamente invasores y fácilmente tolerables por estos pacientes es muy conveniente, ya que suelen tener disminuida su reserva cardiopulmonar.

Hasta ahora no existe una técnica establecida para la aplicación de los procedimientos de terapia celular e ingeniería tisular con células troncales para el tratamiento de este tipo de enfermedad. Se carece de los conocimientos sobre cómo se tienen que liberar e implantar las células a través de los endoscopios para alcanzar el tejido diana y favorecer su cicatrización. El

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

propósito de este trabajo es diseñar y hacer una puesta a punto de una técnica endoscópica que consiga el uso de la terapia celular y de la ingeniería tisular en la patología fistulosa traqueo-bronquial postquirúrgica y en la de origen iatrogénico.

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Hipótesis principal (H1): se puede desarrollar una técnica quirúrgica endoscópica que permita la aplicación de las células troncales autólogas, procedentes del mesénquima, mediante técnicas de terapia celular e ingeniería tisular para el tratamiento de las fistulas traqueo-bronquiales.

Hipótesis operativa: la aplicación de esa técnica endoscópica en casos clínicos refractarios a los procedimientos habituales es factible, sin presentar efectos adversos o aumentar la morbi-mortalidad, favoreciendo el cierre de la patología fistulosa.

Hipótesis nula (H0): la aplicación de la técnica no es factible o conlleva aumentar los riesgos de la intervención convencional para el paciente, sin mostrar efectos beneficiosos sobre los trayectos fistulosos.

Objetivo principal:

1. Diseñar una técnica quirúrgica endoscópica para el tratamiento de las fistulas traqueo-bronquiales con terapia celular e ingeniería tisular.
2. Desarrollar una metodología de validación del diseño de la técnica quirúrgica por medio de algoritmos, que permitan su proceso de ajuste.

Objetivos secundarios:

1. Describir los pasos quirúrgicos esenciales de la técnica quirúrgica diseñada.
2. Confirmar que el procedimiento diseñado es factible y sencillo en su ejecución.
3. Comprobar que la técnica quirúrgica endoscópica de aplicación de las células troncales elaborada es segura.
4. Valorar si el tratamiento con células troncales mesenquimales autólogas procedentes de la grasa es una terapia segura.
5. Analizar la eficacia de la técnica elaborada con empleo de las células troncales mesenquimales autólogas en el tratamiento de las fistulas de la vía aérea, número de fistulas cerradas y grado de cierre o reducción logrado.
6. Establecer en que tipos de fistulas han sido más beneficiosas la aplicación de células troncales mesenquimales autólogas procedentes de la grasa.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Diseño del procedimiento de terapia celular e ingeniería tisular

Constó de dos partes, elección del tipo de célula troncal productora del efecto regenerador y reparador y selección de la matriz para vehicular las células troncales al tejido diana. La matriz seleccionada debía al mismo tiempo actuar como matriz extracelular de las células troncales y bloquear la fístula. Se escogieron para efectuar la terapia celular las células troncales somáticas mesenquimales autólogas procedentes del lipoaspirado de la zona abdominal, las caderas o las piernas. Como vehículo para transportar las células y bloquear el trayecto fistuloso se seleccionó el adhesivo de fibrina (Tissucol Duo 2 ml).

La última parte fue el diseño de la técnica quirúrgica endoscópica para aplicar las células troncales en el trayecto fistuloso.

B. Diseño de la técnica quirúrgica endoscópica

Se estableció un proceso de desarrollo dinámico, por etapas. Se parte de un procedimiento inicial, conocido como procedimiento primario, que reúne los pasos esenciales o críticos de la técnica quirúrgica endoscópica, sin los cuales se desvirtuaría su propósito.

Antes de tratar a cada paciente se hace un análisis de las características de su fístula y se trasladan esos pasos esenciales al paciente. En este proceso de adaptación se definen de forma precisa, *a priori*, como se va a ejecutar cada una de las fases. Al trasladar los pasos críticos al caso particular del paciente el investigador debe modificar esas etapas para que se adapten lo mejor posible a las características de cada caso. Como consecuencia de ese análisis puede ocurrir que la modificación de los pasos no sea suficiente para alcanzar los objetivos quirúrgicos definidos, en ese supuesto se podrán añadir pasos nuevos, que serán sometidos a la misma evaluación que los críticos. Tras cada ensayo (procedimiento quirúrgico endoscópico de aplicación de la terapia regenerativa) se realiza un análisis de la factibilidad de cada uno de los pasos críticos, de los pasos nuevos (se les aplica la escala de factibilidad), de las complicaciones y de los resultados. Como consecuencia de esas reflexiones se modifica la técnica incorporando

pasos no existentes o variando la ejecución de los ya existentes. A través de este proceso de retroalimentación se va perfeccionando la técnica, que iría incorporando las modificaciones introducidas tanto en el análisis de planificación pre como el análisis post. Los cambios así introducidos son probados en el siguiente caso y si sus puntuaciones son favorables se incorporan al procedimiento. Cuando tras varios ensayos de la técnica no se necesitan nuevas modificaciones se considera la técnica quirúrgica endoscópica como bien definida y los pasos nuevos pasaran a considerarse esenciales, formando parte de la misma.

Para disminuir el sesgo asociado a la existencia de varios cirujanos, la ejecución de la técnica quirúrgica endoscópica se restringió a un sólo cirujano. Se escogió, además, un cirujano con la máxima experiencia en la realización de procedimientos endoscópicos terapéuticos, para que el efecto de la curva de aprendizaje tuviera el mínimo impacto.

C. Ámbito

El estudio se llevó a cabo en el Hospital Universitario La Paz. Los servicios implicados fueron: Cirugía Torácica, Cirugía Plástica, Cirugía General del Aparato Digestivo, unidad de endoscopia respiratoria, unidad de terapia celular y servicios generales. El protocolo se efectuó entre los años 2005-2011.

El Hospital Universitario La Paz es un centro hospitalario público de tercer nivel, dependiente de la Comunidad de Madrid y con una población asignada de 500.446 personas. Sumando su área de influencia la población atendida sería de 796.821 personas.

D. Tipo de estudio y periodo

Apoyándonos en los resultados de los trabajos experimentales realizados y en los ensayos clínicos, proyectamos un trabajo prospectivo, piloto, en pacientes con patología fistulosa traqueo-bronquial postquirúrgica y iatrogénica en los que había fracasado la cirugía convencional u otras técnicas endoscópicas.

En el protocolo se valoró la viabilidad y se ajustó la ejecución de la técnica quirúrgica endoscópica de terapia celular e ingeniería tisular, diseñada para la aplicación de la células troncales adultas y cierre de las fistulas.

A los pacientes se les admitió para poder entrar dentro de este estudio clínico bajo dos conceptos diferentes: por uso compasivo y dentro del Ensayo Clínico no comercial EC08/00154 (aprobado por la AEMPS). Previamente a cada tratamiento se le solicitaron al paciente todos los permisos exigidos por la legislación actual, la Declaración de Helsinki, la dirección del HULP y la AEMPS.

Se estimó un número mínimo de tres a cinco pacientes, sin necesidad de un tiempo de separación entre los mismos, para el desarrollo de la técnica. Los pacientes serían correlativos y ordenados cronológicamente.

E. Plan de trabajo, evaluación de las variables y seguimiento

- Cada paciente pudo ser tratado hasta un máximo de dos veces. El segundo o tercer tratamiento se plantearon cuando persistía la fístula y tras la primera aplicación se habían dado valores en efectividad de 1 a 3. Es decir, no se indicaron si se había producido un fallo de curación tras la primera o segunda aplicación, valor 0. No se modificaron las endoprótesis, toracostomías cerradas y abiertas que llevaba el paciente para control de su patología fistulosa y prevenir la aspiración pulmonar.

- Durante el periodo de seguimiento se realizaron pruebas, según fueron consideradas necesarias por su médico de acuerdo con lo expuesto en el ensayo clínico.

- Los puntos de referencia definidos para evaluar las variables en estudio fueron al mes de la aplicación de las células troncales, a los tres meses y al año.

- En todos los pacientes, independientemente de que se retirasen del estudio por falta de efectividad, se les hacía un seguimiento a largo plazo para descartar complicaciones tardías y efectos adversos en relación con su terapia con células troncales. En este caso se consideró suficiente un seguimiento telefónico con su médico.

F. Población en estudio, criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes con patología fistulosa traqueo-bronquial bien establecida a cualquiera de los espacios adyacentes a las vías aéreas centrales (mediastino, esófago o cavidad pleural), en las que han fracasado las terapias habituales o estas no son aplicables.

2. Accesibilidad al abordaje endoscópico.
3. Ser mayor de 18 años de edad.
4. Haber firmado el consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

1. Administración de cualquier fármaco en investigación en el momento actual o tres meses antes del reclutamiento para este estudio.

2. Mujeres embarazadas o en fase de lactancia.
3. Discrasias sanguíneas con riesgo alto de sangrado.
4. Desnutrición extrema que imposibilite el procedimiento de liposucción.
5. Infección pleuropulmonar activa.
6. Necesidad de tratamiento urgente.
7. Fístula mayor de 15 mm no susceptible de tratamiento con esta técnica.
8. Alergia a anestésicos locales o azul de metileno.
9. Alergia a algún componente del Tissucol Duo.
10. Existencia de alguna contraindicación para los procedimientos anestésicos necesarios para la realización de las técnicas endoscópicas.
11. Existencia de contraindicaciones para la realización de endoscopia de la vía respiratoria y/o del conducto digestivo.
12. Antecedentes de abuso de alcohol o de otras sustancias adictivas en los 6 meses anteriores a la inclusión.
13. Enfermedad cardiopulmonar que, en opinión del investigador, resulte inestable o revista la gravedad suficiente para descartar al paciente del estudio.
14. Enfermedad médica o psiquiátrica de cualquier tipo que, en opinión del investigador, pueda suponer un motivo de exclusión del estudio.
15. Sujetos con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, infección crónica por virus de hepatitis B y/o C, tuberculosis diagnosticada en el momento de la inclusión, infección activa por *Treponema pallidum*.

16. Enfermedad neoplásica no controlada.

Criterios de retirada del estudio:

1. Petición del paciente.
2. Aparición de un efecto adverso grave que requiera la aplicación de otro procedimiento terapéutico o fallo de curación que requiera aplicar otra terapia.

G. Pacientes

Se trataron cinco pacientes, tras los que se consideró bien definida la técnica quirúrgica endoscópica, poniéndose fin al estudio.

A continuación se describen las características clínicas de los pacientes tratados, un análisis de los criterios que llevaron a incluirlos en el estudio y una descripción del tipo y características de su fístula. Para reflejar la edad se escogió los años que tenía el paciente cuando fue tratado con la terapia regenerativa.

1. Paciente número uno:

a. Historia médica

Edad: 66

Sexo Hombre

Alergias: a penicilina y a pirazolonas

Hábitos: exfumador de 40 cigarrillos día durante 40 años, que arroja un índice de 80 paquetes año. Bebedor ocasional de cerveza o vino.

Medicación: ninguna

Antecedentes personales: Carcinoma no microcítico de lóbulo superior derecho, diagnosticado cuando tenía 63 años y 4 meses. Estadio clínico T4N2Mx,

Quimioterapia y radioterapia, liberándose 65 Gy, lográndose con ese esquema terapéutico una remisión completa.

Catorce meses después del diagnóstico inicial y lograr la remisión completa presentó una recurrencia con histología de carcinoma epidermoide en la cara lateral derecha de la tráquea distal mediastínica de 10 mm de diámetro (figura 10).

Figura 10.- Imagen bronoscópica del carcinoma traqueal



En la tráquea distal se puede ver el carcinoma epidermoide con un componente exofítico con limitada o nula participación extrínseca como demostraron los estudios de imagen realizados TAC y PET-TAC.

Este carcinoma se consideró un segundo primario por su forma de manifestación clínica y endoscópica más que como una recurrencia de su enfermedad. Se realizó un estudio de extensión que permitió clasificarlo como T4N0M0 clínico (figura 11 y 12).

Figura 11.- Estudios de extensión

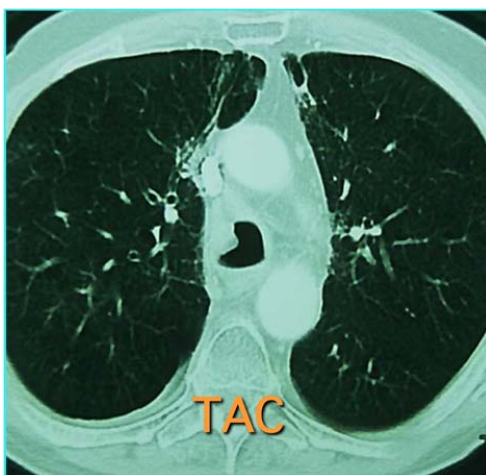
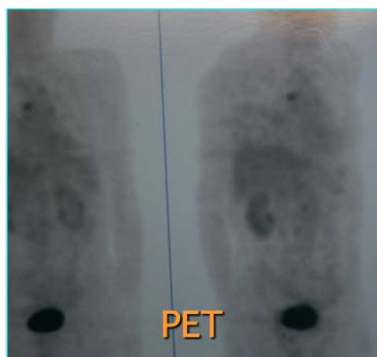


Imagen del carcinoma en la tomografía axial computarizada. Además del componente intraluminal se pueden ver en el parénquima pulmonar de lóbulo superior derecho y del superior izquierdo cicatrices actínicas. No había adenomegalias mediastínicas. El resto del estudio no mostraba enfermedad tumoral.

Figura 12.- Estudio de extensión

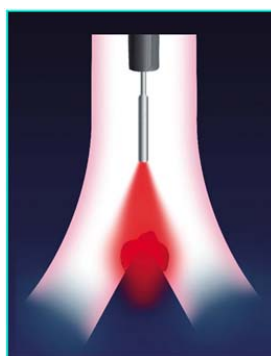


Estudio con tomografía de emisión de positrones donde sólo se ve una captación hipermetabólica del trazado en la zona del nódulo traqueal intraluminal

Discutido el caso en el comité de tumores, se decidió un ciclo de quimioterapia de cuatro semanas. Ante la ausencia de respuesta al mismo, se pensó que el mejor tratamiento era la fotoirradiación con láser de Neodimio-Yag.

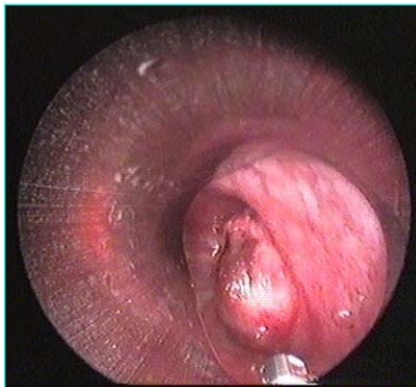
Tres meses después de el diagnóstico de su segundo primario se realizó fototerapia con láser de neodimio-Yag a bajas potencias, 12 vatios y pulsos de 0,5/0,5 segundos de la lesión traqueal, durante 20 minutos (figura 13), con desbridamiento mecánico posterior a la irradiación de la zona necrosada (figuras 14–15). Se logró así a los 6 meses una remisión clínica, endoscópica y microscópica sin evidencia de restos tumorales en las biopsias o citologías de las broncoscopias.

Figura 13.- Esquema de la fotoirradiación



El haz guía constituido por un láser de color rojo de helio permite ajustar la zona de irradiación al tumor macroscópicamente visible. Se hace una halo de iluminación de 5 mm alrededor de la tumoración para incluir en la zona tratada posibles extensiones microscópicas

Figura 14.- Inicio de la fotoirradiación con láser Nd-Yag



Situando la punta de la fibra de láser a 10 mm del tejido diana se irradia todo el volumen tumoral repartiendo la dosis de forma uniforme sobre la superficie con movimientos circulares de barrido, hasta lograr los signos macroscópicos de necrosis manifestos en la (figura 15)

Figura 15.- Imagen de la tumoración tras la finalización de la irradiación

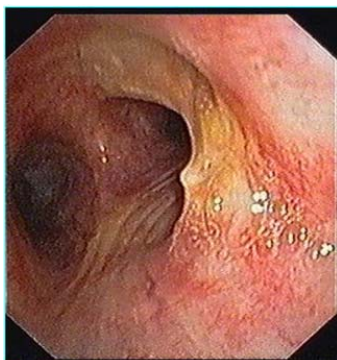


El tumor se ha necrosado, ha cambiado su coloración al desvascularizarse adquiriendo una coloración marrón-oscuro, al mismo tiempo la deshidratación ha encogido el volumen tumoral, que se ha retraído, si lo comparamos con la imagen inicial, la fotoirradiación se mantiene hasta que se logran estos signos, es ilustrativa la comparación con el aspecto macroscópico (figura 10) mostrado al inicio de la irradiación

En la broncoscopia de control evolutivo, realizado tres meses más tarde, se apreció una zona vestigial de menos de 2 mm de diámetro de su carcinoma epidermoide en el margen anterior de la zona tratada. El resto de los estudios, TAC y PET-TAC, fueron negativos. Con el diagnóstico de carcinoma persistente en una zona subtratada en el borde de la primera fotoirradiación, se decidió completar la irradiación en esa zona. Por tanto, se hizo una segunda

fototerapia con láser de Neodimio-Yag con bajas potencias de 12 watios y pulsos de 0,5/0,5 entrando con este tratamiento en remision completa tipo I (figura 16).

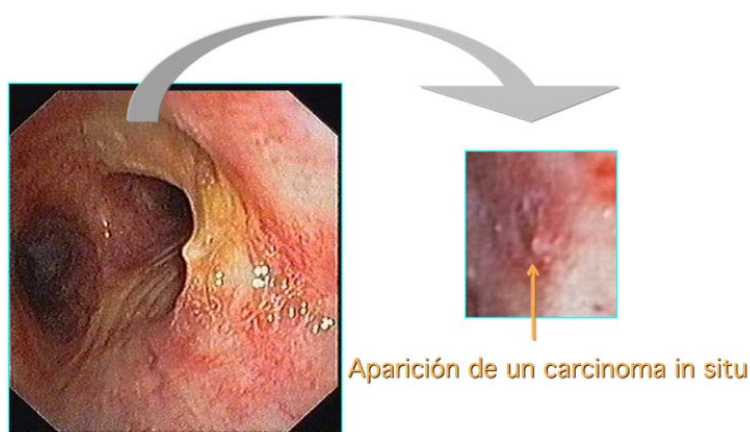
Figura 16.- Imagen endoscópica a los 6 meses de la segunda fotoirradiación



En la pared lateral derecha de la tráquea antes del nacimiento del bronquio principal derecho es posible identificar una zona de distinta coloración que corresponde con tejido cicatricial tras lograrse la epitelización íntegra de la zona irradiada, ya no es visible ni la tumoración ni restos neuróticos. No hay signos macroscópicos, ni microscópicos de persistencia de la tumoración. Hay una remisión completa.

El paciente permaneció en remisión completa tanto macroscópica como microscópica hasta la broncoscopia realizada 19 meses más tarde del segundo tratamiento, cuando se detectó un nuevo carcinoma de célula grande en la zona marginal de la irradiación previa. Tenía un nódulo de la mucosa traqueal con un tamaño de 3-4 mm. El nódulo mucoso superficial se situaba en la cara anterior de la carina traqueal (figura 17).

Figura 17.- Imagen de la recurrencia del carcinoma de célula grande



La imagen izquierda da una visión general de la tráquea a nivel de la carina. En la imagen de la derecha se ha amplificado la irregularidad de la mucosa que en la biopsia bronquial correspondió con la presencia de un carcinoma de célula grande *in situ* de 3-4 mm de diámetro

Se hizo un estudio de extensión y se diagnosticó un TisN0M0, que correspondía a la definición de Central Early Lung Cancer de la Sociedad de Endoscopia Japonesa. Esta sociedad científica recomienda en estos tumores tratamiento endoscópico local. El comité de tumores decidió completar el tratamiento local con láser con quimioterapia liberada en cinco sesiones. Se indicó y realizó una tercera fotoirradiación con láser Neodimio-Yag con potencias de 8-12 watos pulsos 0,5/0,5 y 1/0,5 liberando 8450 julios en 40'. En los controles se vió extensa necrosis sin recidiva.

Tres meses después de la tercera fotoirradiación acudió a consultas a petición propia refiriendo acceso de tos, hemoptisis de 20 ml de sangre roja y expectoración de un fragmento de tejido. En la broncoscopia realizada de urgencia se apreció la presencia en la cara anterior de la carina traqueal de una fístula traqueo-mediastínica (figura 18). Se diagnosticó una mediastinitis necrótica postirradiación. Esta es una complicación conocida de la fotoirradiación con láser cuando se asocia a radioterapia previa a dosis completas¹¹². La primera aproximación fue conservadora, limitándose a la observación. En el control endoscópico a los dos meses de debutar con el episodio de hemoptisis aguda franca se comprobó la persistencia de la fístula sin signos de mejoría.

b. Justificación del tratamiento con células troncales mesenquimales procedentes de la grasa

Primero, se consideró que mantener la actitud conservadora por más tiempo era exponer al paciente a un riesgo muy elevado de erosión de los grandes vasos con éxitus final por una hemoptisis masiva. Este riesgo es muy alto en la mediastinitis necrotizante, sobre todo cuando la ausencia de cicatrización en el periodo de observación indica una persistencia de la misma. Se llevo a cabo una búsqueda en *Medline* de casos de mediastinitis necrotizante. Se encontraron varias publicaciones de casos muy semejantes, siendo en todos ellos la evolución final el éxitus tras una hemoptisis masiva¹¹³⁻¹¹⁵.

Segundo, para evitar ese final se estudiaron distintas opciones terapéuticas, como la cirugía de resección en manguito de la fístula, descartada por los antecedentes de radioterapia a dosis radicales de más de 60 Gy, comportando una alta mortalidad y morbilidad de la cirugía traqueal abierta; o la colocación de una endoprótesis, que efectivamente si bloquearía la fístula

pero no ayudaría a su curación, al revés, la presencia de un cuerpo extraño dificultaría su cicatrización y aumentaría el riesgo de fallecimiento por hemoptisis.

Se consideró que las células troncales ASCs, multipotentes con capacidad de regeneración de diferentes tejidos mesenquimales, con un potente efecto angiogénico y, lo que es más importante, capaces de secretar diversos factores bioactivos (factores de crecimiento, citoquinas) que favorecerían la reparación de tejidos dañados e inhibirían la apoptosis, limitando así la inflamación crónica y favoreciendo el cierre de la fístula, evitando el desenlace fatal. Dado el riesgo latente de la hemoptisis se decidió la aplicación directa de la fracción vásculo-estromal, considerado el procedimiento más rápido, sin esperar a la expansión en cultivo de las células troncales, que supondría una demora de más de un mes.

Concluyendo, se estimó que se beneficiaría de la terapia celular e ingeniería tisular con células troncales somáticas mesenquimales de origen adipogénico.

c. Visita 0: inclusión en el estudio, primer tratamiento

Firma del consentimiento informado.

Cumplía todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión.

Escala de síntomas basal:

Tos: 2 moderada interrumpe algunas actividades; expectoración: 2 expectoración moderada < de 20 ml; tipo de expectoración: 0 blanquecina; hemoptisis 1 leve, algún esputo esporádico (en una ocasión ha llegado a expectorar un molde completo de sangre); dolor: 2 moderado, ocasionalmente necesita un analgésico. El dolor es de localización lumbar; disnea: 0 ausencia de disnea; astenia: 0 no; anorexia: 0 no; pérdida de peso 0 no; karnofsky: 80% actividad normal con esfuerzo y algunos síntomas;

Hallazgos broncoscópicos:

Se encuentra fístula traqueo-mediastínica en la cara anterior derecha de la carina traqueal, en la zona de máxima irradiación previa con el láser de Neodimio-Yag. A través de la boca de la fístula se accede sin dificultad, dado su gran tamaño de más de 6 mm, unos 12-14 mm al compartimento mediastínico. Este está formado por paredes cruentas de tejido mediastínico

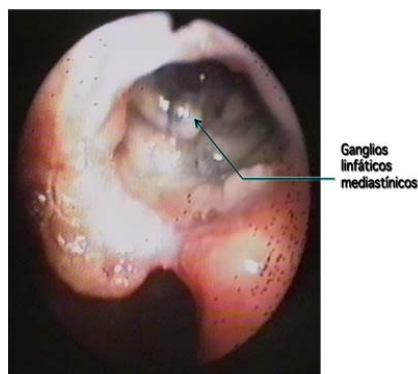
que muestran signos de inflamación crónica, visualizándose en las paredes también ganglios antracóticos y la pared de la vena cava superior (figura 18 y 19). Comparando esta broncoscopia con la realizada 2 meses antes no se observaban cambios significativos.

Figura 18.- Aspecto de la fistula traqueo-mediastínica



En la cara anterior de la carina traqueal se observa una solución de continuidad muy amplia de 12-14 mm, la fistula tiene un tamaño igual o superior a la luz del los bronquios principales. Los bordes de la fistula son irregulares y por dentro la estructura de la pared traqueal ha desaparecido por completo.

Figura 19.- Hallazgos endoscópicos



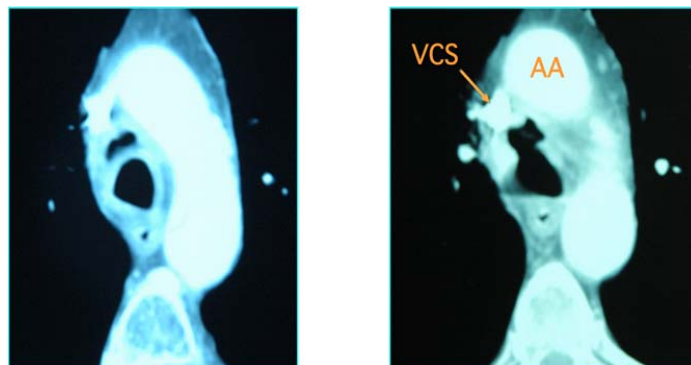
En una visión endoscópica más cercana a la fistula es fácil reconocer los elementos expuestos del mediastino, debido a la amplia necrosis de la pared traqueal. Con una flecha se señalan las adenopatías mediastínicas del espacio pretraqueal y retrocava.

Hallazgos iconográficos:

En el TAC se visualizaba de forma más exacta las dimensiones de la fístula, que tenía un volumen considerable (20X20 mm). La cara mas anterior de la fístula estaba formada por la

pared posterior de la vena cava superior, como se puede apreciar en las imágenes del TAC en los cortes mediastínicos (figura 20).

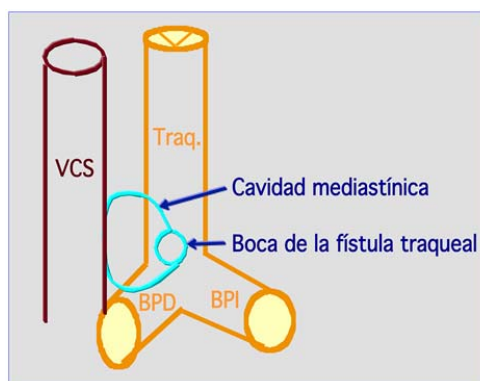
Figura 20.- Hallazgos iconográficos en el TAC torácico



En estos dos cortes axiales dados, el de la izquierda a nivel del cayado de la aorta, y el de la derecha a nivel de la ventana aortopulmonar, unos 10 mm por encima de la carina traqueal, se pueden apreciar las grandes dimensiones de la fistula necrotizante mediastínica. La cara anterior de la misma la forma la cara posterior de la vena cava superior (VCS señalado con una flecha), poniendo de manifiesto el riesgo de erosión de dicho vaso. La aorta ascendente (AA) quedaba a escasos milímetros.

Para comprender mejor la disposición espacial de la fistula con respecto a la tráquea y la vena cava superior se ha realizado el esquema representado en la (figura 21).

Figura 21.- Representación esquemática de la mediastinitis necrotizante



En este esquema en 3D se ha representado la tráquea (Traq.), los bronquios principales derecho (BPD) e izquierdo (BPI), la boca de la fistula, la cavidad necrotizante mediastínica y su relación con la vena cava superior (VCS).

Características de la fistula:

Tipo: fistula tráqueo-mediastínica.

Localización: cara anterior derecha de la carina traqueal, inmediatamente antes del nacimiento de los bronquios principales.

Tamaño: boca de la fistula 12-14 mm. Profundidad de 12 mm aproximadamente, con un volumen en el TAC de 20X20 mm.

Duración: dos meses.

Tratamiento previo: conservador. Imposibilidad de aplicar otros tratamientos.

2. Paciente número dos:

a. Historia médica

Edad: 65

Sexo Hombre

Alergias: ninguna

Hábitos: exfumador de 50 cigarrillos día durante 20 años, que arroja un índice de 50 paquetes año. Bebedor de 70 gr de alcohol al día en forma de cerveza

Medicación: Nifedipino 30 mg cada 24 horas, en comprimido de liberación retardada, para su HTA, Valproato sódico, en comprimido de 200 mg, 1 comprimido cada 8 horas, para su epilepsia.

Antecedentes personales: Paciente con hipertensión arterial esencial. Hemorragia subaracnoidea grado IV de Fisher, por rotura de aneurisma de la comunicante cerebral anterior, a los 57 años de edad. Como consecuencia de la misma entró en coma y precisó de ventilación mecánica prolongada.

Un mes y medio más tarde de la instauración de la hemorragia subaracnoidea se embolizó el aneurisma de la comunicante anterior. La ventilación mecánica se prolongó durante 49 días. Durante su permanencia en ventilación asistida desarrolló una fistula esófago-traqueal inflamatoria iatrogénica por intubación orotraqueal prolongada.

Fue intervenido a los cuatro meses de la hemorragia realizándose resección en manguito de la fistula traqueal media 15 mm (25 mm de resección traqueal) con anastomosis traqueal termino-terminal y cierre directo de la fistula esofágica reforzándolo con mioplastia del músculo esternotiroideo. A los diez días de la intervención se produjo recurrencia de la fistula traqueo-esofágica.

Ante la imposibilidad de nueva cirugía curativa se indicó bloqueo paliativo de la fístula con endoprotesis traqueal de Polyflex de 18X30 mm, llevada a cabo en el Hospital Universitario La Paz a los 7 meses de producirse la hemorragia subaracnoidea. Esta endoprótesis tuvo que ser retirada a los 2 meses de su implantación por formación de granulomas. Para mantener bloqueada la fístula después de retirar la prótesis traqueal se implantó una endoprótesis esofágica. Esta prótesis esofágica migró en unos días. Se implantó otra segunda prótesis esofágica mas amplia, que también migró, por lo que como único recurso se puso de nuevo la endoprótesis traqueal.

Esta endoprótesis permaneció sin recambios durante siete años durante los cuales el paciente estuvo en su país de origen (Gran Bretaña). Cuando retornó a España se detectó formación de granulomas y colonización bacteriana de la prótesis, siendo necesario de nuevo su retirada. El paciente sufre de pérdida de visión casi total desde su primer ingreso, cuando se le diagnosticó hemorragia vítrea organizada bilateral, a lo que se añade como secuela neurológica de su hemorragia las crisis comiciales.

b. Justificación del tratamiento con células troncales mesenquimales procedentes de la grasa

Se consideraron las diversas opciones:

- La cirugía de resección en manguito, procedimiento de elección, ya no era factible después del fracaso de la primera intervención, con la reproducción de la fístula traqueo-esofágica en el postoperatorio inmediato. Se consideró que la reintervención tendría un riesgo vital y bajas probabilidades de éxito después del fallo inicial.

- El uso de endoprótesis traqueales y esofágicas habían presentado algunas dificultades, no siendo posible alcanzar una situación estable por diferentes complicaciones de las endoprótesis. Las traqueales autoexpandibles de silicona poliéster habían tenido un resultado aceptable pero no exento de problemas, pues habían tenido que ser cambiadas en tres ocasiones en el periodo de siete años, por la formación de granulomas en sus extremos y colonización bacteriana. Se había ensayado, también, el bloqueo de la fístula con endoprótesis esofágicas, para prevenir la formación de granulomas traqueales. En las dos ocasiones que se empleó esta estrategia, las endoprótesis esofágicas migraron, teniendo que recurrir de nuevo a la endoprótesis traqueal.

Ante la imposibilidad de realizar cirugía y las dificultades de lograr una situación estable y definitiva con las endoprótesis, se pensó que las células troncales ASCs por sus características serían una buena opción terapéutica para favorecer el cierre de la fístula sin exponerle a nuevos y elevados riesgos quirúrgicos. Si así se lograba el cierre, se podría evitar el tratamiento paliativo con las endoprótesis, librándole de sus inconvenientes.

Concluyendo, se estimó que se beneficiaría de la terapia celular e ingeniería tisular con células troncales somáticas mesenquimales de origen adipogénico.

Como para las fistulas traqueo-esofágicas se contaba con la autorización de la AEMPS, las células troncales mesenquimales una vez extraídas se sometieron a expansión mediante cultivo celular por la empresa Cellerix durante dos meses.

c. Visita 0: inclusión en el estudio, primer tratamiento

Firma del consentimiento informado.

Cumplía todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión.

Escala de síntomas basal:

Tos: 3 intensa en salvas tusígenas que interrumpe algunas actividades; como andar o dormir; expectoración: 3 expectoración grave > de 20 ml; tipo de expectoración: 1 purulenta; la tos y la expectoración se producen sobre todo en relación con la ingesta de líquidos; hemoptisis 0 ninguna; dolor: 0 ninguno; disnea: 0 ausencia de disnea; astenia: 0 no; anorexia: 0 no; pérdida de peso 1 si ; karnofsky: 80% actividad normal con esfuerzo y algunos síntomas;

Hallazgos broncoscópicos:

El paciente era portador de una endoprótesis de silicona poliéster autoexpandible que bloquea en trayecto fastuoso. La prótesis traqueal tenía su extremo proximal a nivel del cricoides, por lo que había que retirar la prótesis para acceder a la visualización de la fístula.

Se encontró fístula traqueo-esofágica situada en la tráquea cervical, a 51 mm de las cuerdas vocales en su cara posterior próxima a la unión de la membranosa con los cartílagos de la cara lateral izquierda. La fístula tiene un tamaño de 3 mm, con un trayecto que no se puede evaluar en la broncoscopia. Los bordes de la fístula están completamente epitelizados.

Hallazgos esofagoscópicos:

Se observa fístula situada en la cara anterior del esófago a aproximadamente 20 mm de la boca de Killian (figura 22). La fístula tiene una forma cónica siendo más ancha su boca en el lado esofágico donde mide 6 mm, desde donde tiene un trayecto descendente de izquierda a derecha, de posterior a anterior, de unos 6-10 mm con una entrada en tráquea mas estrecha de 3 mm. Todo el trayecto fistuloso desde la entrada en la cara anterior del esófago hasta la traquea esta recubierto por una mucosa, sin solución de continuidad.

Figura 22.- Imagen endoscópica de la fístula por el lado esofágico



Hallazgos iconográficos:

En el TAC se visualizaba la fístula traqueoesofágica (figura 23) con un tamaño en el lado traqueal de 2 mm, La fístula tenía un trayecto de unos 8 mm, oblicuo de izquierda a derecha, entrando en la tráquea en su cara membranosa posterior al lado de la pared cartilaginosa izquierda. El diámetro de la fístula en su entrada en el esófago era mayor que el orificio traqueal. A nivel traqueal, situada por debajo de cricoides, se observó una endoprótesis cilíndrica de 18 mm de diámetro por 30 mm de longitud, que bloqueaba el trayecto fistuloso figura 24).

Figura 23.- Imagen en el TAC de la fístula esófago-traqueal

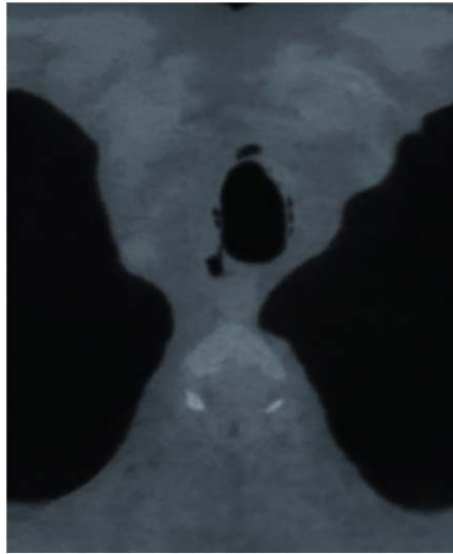
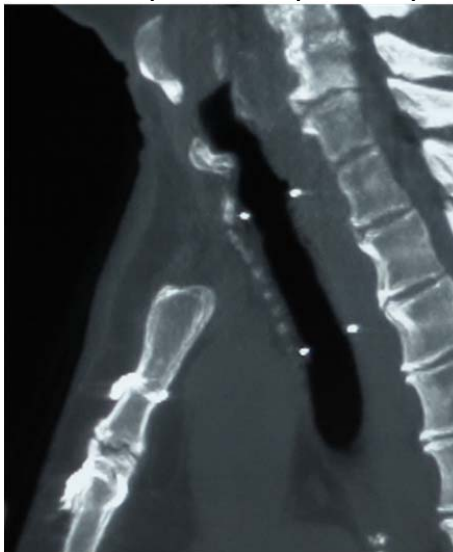


Figura 24.- Imagen radiológica de la endoprótesis traqueal bloqueando la fístula



Los extremos superior e inferior de la endoprótesis son radioopacos

Características de la fístula:

Tipo: fístula traqueo-esofágica crónica, bien establecida.

Localización: cara membranosa de la traquea cervical a 51 mm de las cuerdas vocales, en el lado izquierdo junto a la pared cartilaginosa izquierda. Por el lado esofágico la fístula se sitúa en la cara anterior del esófago a 20 mm de la boca de Killian

Tamaño: de 6 mm por el lado esofágico y de 3 mm por el lado traqueal, con una profundidad de 6-10 mm

Duración: 84 meses.

Tratamientos previos: Primero, cirugía de resección en manguito traqueal con cierre de la fistula esofágica y mioplastia, con recurrencia de la fistula en el postoperatorio inmediato. Segundo, bloqueo de la fistula con varias endoprótesis traqueales y esofágicas, que han tenido que ser modificadas o cambiadas en varias ocasiones por dos circunstancias, por formación de granulomas en los extremos de las prótesis traqueales con colonización bacteriana y otras dos veces por migración de las endoprótesis esofágicas, sin lograr una situación estable y satisfactoria.

3. Paciente número tres:

a. Historia médica

Edad: 65 años

Sexo Hombre

Alergias: ninguna

Hábitos: exfumador de 40 cigarrillos día durante 21 años, que arroja un índice de 42 paquetes año. Consumo de alcohol de riesgo, valorado en 60-80 gr/día

Medicación: ninguna

Antecedentes personales: A los 59 años fue diagnosticado de un carcinoma escamoso del lóbulo inferior izquierdo, fue tratado con neumonectomía intrapericárdica con estadio patológico de T3 N1. El comité de tumores de su centro de referencia indicó completar la cirugía con 23 Gy de cobalto terapia. Durante la radioterapia presentó expectoración purulenta y desarrolló un empuje de su cavidad de neumonectomía. Se diagnosticó una fistula de muñón de neumonectomía. Fue tratado con una toracostomía abierta (resección de arcos costales 7º y 8º). A los 61 años se detectó una metástasis hepática única que fue resecada, completándose la resección con cuatro ciclos de quimioterapia con cisplatino-vinorelbina. Desde entonces se mantuvo en remisión completa pero con persistencia de la fistula de neumonectomía, que no ha respondido a la toracostomía abierta con curas diarias directas de la fistula.

b. Justificación del tratamiento con células troncales mesenquimales procedentes de la grasa

Ante la imposibilidad de cirugía de cierre directo de la fístula, por la existencia de radioterapia previa, de la complejidad de otras soluciones quirúrgicas, como el uso de mioplastia, unido a la falta de respuesta a la toracostomía abierta; el paciente se considera un candidato idóneo para el tratamiento con técnicas de terapia celular e ingeniería tisular con células troncales somáticas mesenquimales procedentes de la grasa.

c. Visita 0 inclusión en el estudio, primer tratamiento

Firma del consentimiento informado.

Cumplía todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión.

Escala de síntomas basal:

Tos: 1 leve fácilmente tolerable; expectoración 1 leve expectora algo; tipo de expectoración: 1 purulenta; hemoptisis 0 ninguna; dolor: 0 ninguno; disnea: 2 disnea al andar en llano de menos de un piso ; astenia: 0 no; anorexia: 0 no; pérdida de peso 0 no; karnofsky: 80% actividad normal con esfuerzo y algunos síntomas;

Hallazgos broncoscópicos:

Se evidenció una fístula broncopleurale de muñón de neumonectomía izquierda. Árbol bronquial derecho normal. En el árbol izquierdo se encontró un bronquio principal izquierdo de 30 mm al final del cual había un muñón de neumonectomía con una fístula de 4 mm en su zona central (figura 25). La fístula tiene dos entradas, con una profundidad de 10 mm, no llegándose a ver la cavidad pleural.

Figura 25.- Imagen de la fistula por broncoscopia



Hallazgos pleuroscópicos:

La pleuroscopia se realizó con un broncoscopio flexible. Explorada desde la cavidad pleural ofreció la visión de una fistula de 4 mm (figura 26). La fistula se situaba en la zona central de la cara mediastínica, con los bordes claramente epitelizados. El epitelio bronquial se continuaba sin solución de continuidad con la mucosa bronquial. Desde el lado pleural la longitud del trayecto fistuloso tampoco permitió ver el bronquio. El diámetro de la fistula no permitió el paso del broncoscopio.

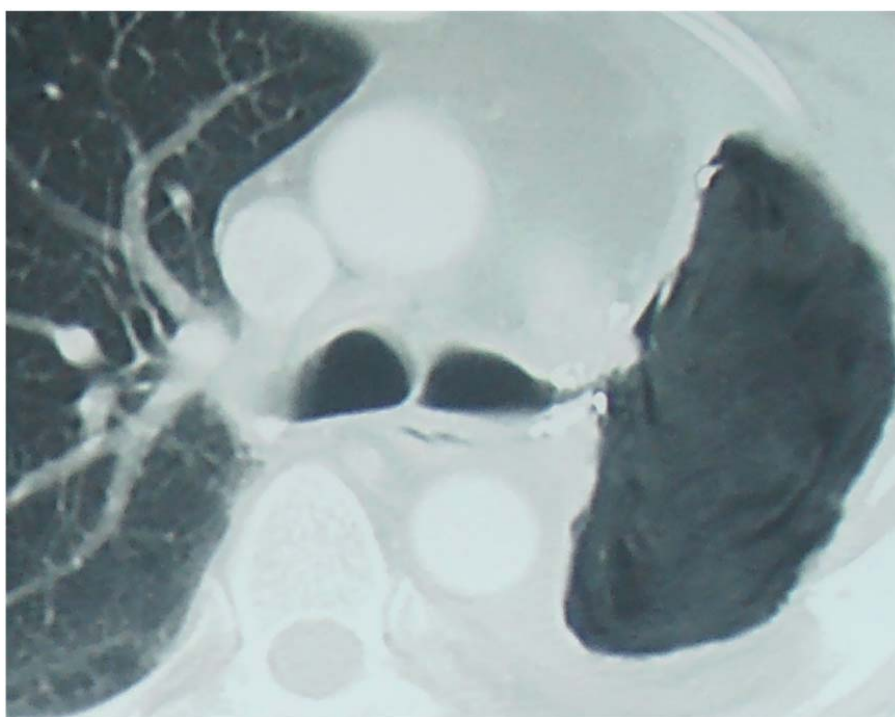
Figura 26.- Imagen endoscopica pleural de la fistula broncopleural



Hallazgos iconograficos.

En el TAC se visualizaba la fístula broncopleurale de aproximadamente 10 mm de longitud, que comunicaba la luz del bronquio izquierdo con la cavidad pleura llena de compresas quirúrgicas. El diámetro de las bocas era de 3 mm (figura 27).

Figura 27.- Imagen en el TAC de la fístula



Dentro de la cavidad pleural se ven las compresas

Características de la fístula:

Tipo: fístula broncopleurale de muñón de neumonectomía izquierda de carácter crónico.

Localización: zona central del muñón de neumonectomía con un bronquio principal izquierdo largo

Tamaño: 4 mm por ambos lados ,con una profundidad de 10 mm.

Duración: 48 meses.

Tratamiento previo: toracostomía abierta.

4. Paciente número cuatro:

a. Historia médica

Edad: 52 años

Sexo Hombre

Alergias: ninguna

Hábitos: exfumador de 20 cigarrillos día durante 30 años, que arroja un índice de 30 paquetes año. No otros hábitos.

Medicación: Omeprazol 20 mg cada 24 horas, sulfato de hierro 525 mg cada 24 horas, Cefditoreno 400 mg cada 12 horas, Buprenorfina 20 mg ½ parche cada 72 horas. Loracepam 1 mg cada 24 horas, Sulfametoxazol-trimetropin 800/160 mg cada 12 horas, Enoxaparina 40 mg subcutáneo cada 24 horas

Antecedentes personales:: A los 52 años fue diagnosticado de un carcinoma neuroendocrino de célula grande del lóbulo inferior derecho. Se hizo lobectomía inferior derecha por técnica de cirugía torácica videoasistida con estadificación patológica de T2N0M0. A los 14 días comenzó con expectoración mucopurulenta y aparición de un hidroneumotórax en el lado operado. En la broncoscopia realizada se diagnosticó fístula completa del muñón de lobectomía inferior derecha. El paciente fue reintervenido con carácter de urgencia por toracotomía reamputándose el muñón de lobectomía, quedando la nueva sutura al ras del intermediario justo debajo de la salida del lobar medio. En el postoperatorio inmediato de esta cirugía desarrolló un segundo hidroneumotórax. Un mes más tarde la fístula persistía y el paciente fue remitido para valoración de tratamiento con terapia celular e ingeniería tisular. En el estudio endoscópico de la vía aérea realizado en ese momento se visualizó una fístula bronquial (broncopleural) situada en el bronquio intermediario en su cara lateral interna por encima de la salida del lobar medio.

b. Justificación del tratamiento con células troncales mesenquimales procedentes de la grasa

Enfrentados a la evolución desfavorable con la cirugía videoasistida, que se complicó con una fístula bronopleural del muñón de lobectomía, que no se ha logrado solucionar con la reintervención por cirugía estándar; se consideró que los riesgos de una tercera intervención

serían muy altos. Esta cirugía, además, implicaría sacrificar el lóbulo medio o incluso realizar una neumonectomía. Por todo eso, el paciente se consideró un candidato idóneo para el tratamiento con células troncales procedentes de la grasa. Se quiso evitar con esta actuación temprana su prolongación en el tiempo.

c. Visita 0: inclusión en el estudio

Firma del consentimiento informado.

Cumplía todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión.

Escala de síntomas basal:

Tos: 1 leve fácilmente tolerable; expectoración 1 leve expectora algo; tipo de expectoración: 0 blanquecina; hemoptisis 0 ninguna; dolor: 0 ninguno; disnea: 2 disnea al andar en llano de menos de un piso ; astenia: 0 no; anorexia: 0 no; pérdida de peso 0 no; karnofsky: 80% actividad normal con esfuerzo y algunos síntomas;

Hallazgos broncoscopicos:

Se objetivó una fístula broncopleurale en la cara interna del bronquio intermediario (figura 28 y 29), en donde se extendía la resección de reamputación bronquial realizada en la segunda cirugía de la fístula del muñón de lobectomía. Esta fístula se situó en el intermediario por encima de la salida del lobar medio. El árbol bronquial izquierdo era normal.

Figura 28.- Imagen broncoscópica de la fístula



La fístula broncopleurale se situaba en la cara interna del intermediario por encima de la salida del bronquio del lóbulo medio, a la dcha de la imagen

Figura 29.- Imagen bronoscópica más cercana



Hallazgos pleuroscópicos:

Explorada a través del toracostoma cerrado, la fístula desde la cavidad pleural estaba rodeada de fibrina y esfacelos que impedían su correcta identificación. No se consideró una vía aceptable para realizar el tratamiento.

Hallazgos iconográficos.

En el TAC se visualizaba la fístula broncopleurale de aproximadamente 3-4 mm de diámetro que comunicaba la luz del bronquio intermediario con la cavidad pleural en el seno

costofrenico posterior, con una profundidad de 5 mm comprendiendo la totalidad de la pared bronquial (figura 30).

Figura 30.- Imagen en el TAC de la fistula



A la izquierda la ventana de mediastino y a la derecha la de pulmón. En la cavidad pleural se ve el drenaje torácico

Características de la fístula

Tipo: fístula broncopleurale de muñón de lobectomía inferior derecha al ras.

Localización: cara interna del bronquio intermediario por encima del nacimiento del lobar medio.

Tamaño: 3 mm por el lado bronquial, de profundidad tiene el mismo tamaño (5 mm) que el grosor de la pared bronquial

Duración: una semana.

Tratamiento previo: cirugía abierta con reamputación y resutura del muñón bronquial fistulizado.

5. Paciente número cinco:

a. Historia médica

Edad: 18

Sexo Mujer

Alergias: ninguna

Hábitos: ninguno

Medicación: Espirolactona 25 mg cada 12 horas por gastrostomía, Hidroclorotiazida 25 mg cada 12 horas por la gastronomía, Omeprazol 20 mg cada 24 horas, Domperidona 10 mg cada 8 horas.

Diagnostico principal: Síndrome congénito de DiGeorge con microdelección de 22q11

Diagnósticos secundarios: Cardiopatía congénita consistente en atresia pulmonar con comunicación interventricular y arco aórtico derecho.

Antecedentes personales: Fue intervenida en periodo postnatal practicándose una fístula vascular sistémico pulmonar con la hemiácigos desde el tronco innominado a la arteria pulmonar derecha.

A la edad de cinco años fue diagnosticada de fístula vascular hipofuncionante. Se realizó corrección del conducto valvulado de PTFE entre ventrículo y tronco de la arteria pulmonar.

A los ocho años de edad se practicó angioplastia efectiva en la arteria pulmonar derecha a nivel de la desembocadura de la fístula vascular.

Seis años mas tarde se detectó hipoperfusión de sistema pulmonar, implantandose stent vascular autoexpandible de 8X30mm en una colateral dependiente de la arteria subclavia izquierda mejorándose la percusión de lóbulos pulmonares medio e inferior derecho, y conexión con la arteria pulmonar izquierda.

Un año después se había desarrollado una estenosis distal al *stent* vascular implantado la los catorce años de edad. Esta estenosis se maneja con nueva colocación de un segundo *stent* de 7X40 mm.

Seis meses después de liberado este segundo *stent*, teniendo 17 años de edad, se produce aneurisma micótico de 50 mm a nivel de la arteria subclavia izquierda. El aneurisma comprime el esófago y el bronquio principal izquierdo causando atelectasia completa del pulmón izquierdo. Se indicó intervención de su aneurisma, durante el procedimiento quirúrgico se produjo fístula vascular con el bronquio principal izquierdo con sangrado masivo por el tubo orotraqueal. En la

broncoscopia flexible hecha en ese momento se constató fistula en la pared del bronquio principal izquierdo. Se hizo una broncorrafia con puntos sueltos de sutura trenzada reabsorbible de 3/0 de poliglactin 910 (Vicryl®). Con estas maniobras se controló la hemorragia.

A partir de ese momento se sucedieron en cadena una serie de intervenciones para tratar las complicaciones. En una primera intervención se quitó un parche de Dacron y se sustituyó por un parche de Goretex en la salida del ventrículo derecho al tronco principal de la arteria pulmonar para resolver una estenosis de este último.

En el postoperatorio inmediato, tres días más tarde, se apreció absceso friable en el seno del anterior aneurisma micotico. Se intervino de urgencia drenándose el espacio abcesificado. A los quince días de esta intervención en el TAC de control realizado se confirmó la persistencia del absceso. El TAC también detectó una cavidad aérea en el mediastino situada por detrás del bronquio principal izquierdo, con una fístula de 1,2 mm de diámetro en su cara posterior. Esta oquedad mediastínica también tenía comunicación con el esófago. La broncoscopia confirmó la presencia de la fístula broncomediastínica-esofágica. Ocho días más tarde de estas exploraciones radiológicas y endoscópicas se reintervino de nuevo. Para tratar la fístula broncomediastínicaesofágica se realizó broncoplastia con cierre directo de la fístula bronquial, cierre también directo de la fístula en la pared esofágica en dos planos e interposición entre el bronquio y el esófago en la cavidad pleura del músculo dorsal ancho izquierdo. A pesar del empleo de un colgajo muscular para mejorar la vascularización y la cicatrización, la fístula bronco-esofágica recurrió. Sin disponer de más recursos diez días después de la mioplastia se procedió a efectuar una toracostomia abierta junto con exclusión del esófago. Para bloquear el transito esofágico se ligó en bloque el esófago a nivel cervical y abdominal practicandose simultáneamente un faringostoma. La gastrostomia ya había sido realizada previamente. Con este tratamiento de recurso la paciente salió adelante pero sin lograrse la cicatrización la fístula bronco-esofágica.

b. Justificación del tratamiento con células troncales mesenquimales procedentes de la grasa

Se evaluaron distintas alternativas:

La cirugía con broncoplastia de su fístula bronquial, resección en manguito del bronquio principal izquierdo afecto con anastomosis termino-terminal, se consideraba de alto riesgo,

pudiendo terminar en neumonectomía izquierda que llevaría a la paciente a una situación final. Además, aunque pudiera llevarse a cabo persistiría el problema de su esófago, que precisaría de una esofagectomía con colonoplastia. Las múltiples intervenciones quirúrgicas habían dejado diversas cicatrices en la cavidad torácica que tornaban cualquier opción quirúrgica en un gran desafío y riesgo vital para la paciente.

Ante la imposibilidad de realizar cirugía, se consideró que las células troncales ASCs por sus propiedades podrían favorecer el cierre de la fístula sin exponerle a nuevos riesgos quirúrgicos. Si se lograba el cierre, supondría una notable mejoría en su calidad de vida solucionando uno de sus problemas clínicos.

Concluyendo, se estimó que se beneficiaría de la terapia celular e ingeniería tisular con células troncales somáticas mesenquimales de origen tejido adiposo.

Dado que se contaba con la autorización de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, las células troncales mesenquimales una vez extraídas se sometieron a expansión, mediante cultivo celular por el laboratorio de terapia celular del Hospital Ramón y Cajal.

c. Visita 0: inclusión en el estudio, primer tratamiento

Firma del consentimiento informado.

Cumplía todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión.

Escala de síntomas basal:

Tos: 2 moderada, interrumpe algunas actividades; tipo de tos ocasional; expectoración: 1 expectoración leve expectora algo; tipo de expectoración: 1 blanquecina; hemoptisis 0 ninguna; dolor: 0 ninguno; disnea: 2 disnea al andar en llano de menos de un piso, tiene episodios de disnea en reposo de duración limitada 3-5 minutos; astenia: 0 no; anorexia: 0 no; pérdida de peso 0 no; karnofsky: 60% necesita cuidados no puede cuidarse por si sola;

Hallazgos broncoscópicos:

En la tráquea en su cara anterior a nivel del tercer anillo cartilaginoso existía una cicatriz con ausencia del segmento anterior del cartílago, que marca la situación de la traqueotomía previa. Ese segmento traqueal tenía cierto componente malácico con colapso parcial, reducción

de un 50% de su luz con las maniobras extremas de tos. Árbol bronquial derecho era normal. El árbol bronquial izquierdo tenía aumentadas sus secreciones de coloración blanquecina. En la cara posterior del bronquio principal izquierdo, a más de 30 mm de la carina traqueal en la cara posterior membranosa antes de la división de los lobares, existía una fistula de 2-3 mm en reposo que al avanzar el extremo del endoscopio se abría permitiendo su paso, aproximadamente con un tamaño de 6 mm. Los bordes de la fistula estaban tapizados por una mucosa sin solución de continuidad con la luz esofágica

Hallazgos pleuroscópicos:

A través del toracostoma de 5X5 cm se accedió a la cavidad pleura donde se había formado una cámara única donde confluye la luz esofágica, en el techo de la cavidad persistía el trayecto esofágico superior, que acababa en un fondo de saco tras aproximadamente 15 cm. En el seno de la luz esofágica había retenido material hemostático fijado a las paredes por sutura de Prolene. Este material no se manipuló al encontrarse firmemente adherido a la pared esofágica a nivel del cayado aórtico. En el suelo de la cavidad pleural nacía el bolsón esofágico inferior, de unos 10 cm que también acababa en fondo de saco. En el fondo de la cavidad en el lado pulmonar se situaba la fistula de aproximadamente 6 mm (figura 31).

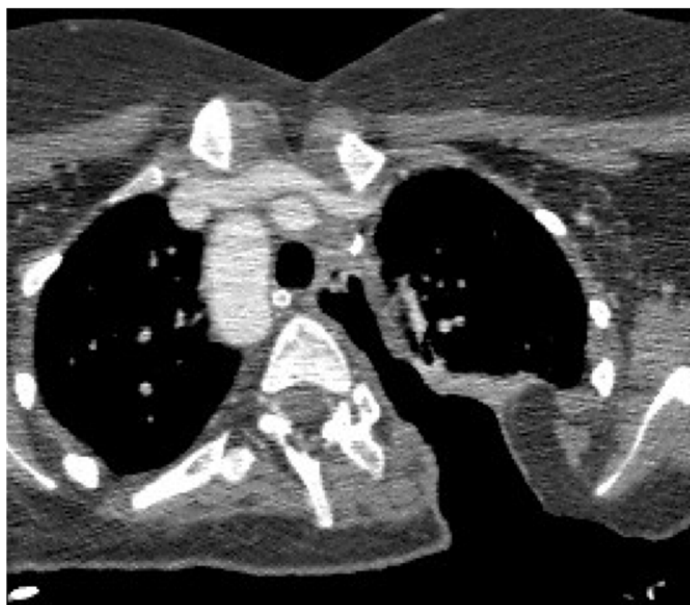
Figura 31.- Visión de la fistula desde el lado esofágico



Hallazgos iconográficos:

Llamaba la atención la existencia de un defecto en la pared torácica del hemitórax izquierdo, situado en la cara posterior por dentro de la escápula. Este defecto, con ausencia de los arcos costales, unía la piel sin solución de continuidad con la luz del esófago (figura 32). En comparación con los TAC previos, ya no era visible la cavidad mediastínica descrita en los estudios anteriores. Debido a las alteraciones que producía este defecto era imposible identificar y medir la fistula bronco-esofágica. El TAC se desestimó tanto para la valoración inicial como para el seguimiento.

Figura 32.- Imagen del TAC a nivel de la toracostomía abierta



Características de la fístula:

Tipo: fístula bronco-esofágica crónica, bien establecida.

Localización: cara membranosa posterior del bronquio principal izquierdo situada justo antes de la división de los lobares izquierdos. Es posible pasar la punta del broncoscopio por la fístula accediendo al esófago.

Diámetro 6 mm. Profundidad 2-3 mm

Duración: 12 meses.

Tratamientos previos: Tres intentos de cierre directo, uno con interposición del músculo dorsal ancho, toracostomía abierta y exclusión esofagica con curas diarias durante 12 meses.

H. Variables

1. Variable principal

a. Factibilidad: aplicación del procedimiento diseñado sin encontrar dificultades técnicas en su ejecución, incluyendo las modificaciones de los pasos críticos o pasos nuevos pre y post introducidas tras cada ensayo. Para poder estimar esta variable de forma adecuada se elaboró la siguiente escala numérica:

- 0 Ejecución imposible.
- 1 Ejecución casi imposible.
- 2 Difícil de usar, utilizable si no existen alternativas.
- 3 Posible con algunas incidencias graves en la ejecución.
- 4 Fácil de realizar.
- 5 Excelente.

Esta escala se aplicó con algunas simplificaciones a cada uno de los seis pasos definidos como críticos. Cuando los valores resultantes de aplicar esta escalas de factibilidad resultaran inferiores o iguales a dos llevaría a aceptar la hipótesis nula y valores superiores a dos a lo opuesto. Para su síntesis se utilizó el mínimo denominador, es decir, el valor más bajo logrado en la puntuación de los seis pasos se adscribió a la variable principal, factibilidad, ya que si alguno de esos seis pasos era de difícil ejecución, lo era la técnica en su conjunto. Los pasos nuevos fueron puntuados también con la escala de factibilidad, pero no contaron a la hora de sintetizar la variable principal.

Los seis pasos en los que se puntuó su factibilidad fueron:

- Factibilidad en la obtención de las ASCs:

Aquí los valores fueron absolutos, estableciéndose un número mínimo de células para poder realizar la terapia:

0 - Si el número de células de la fracción vásculo-estromal era inferior a 2 millones o tras el proceso de expansión en cultivo celular la cuantía era inferior a 20 millones.

5 - Si el número de células era superior a 2 millones de células en la fracción vásculo-estromal o 20 millones tras expansión celular.

- Factibilidad de la identificación de la fístula por broncoscopia.

- 0 - Identificación imposible.
- 1 - Identificación casi imposible.
- 2 - Identificación difícil de realizar, es preferible usar otros métodos.
- 3 - Identificación posible con algunas carencias.
- 4 - Identificación fácil de realizar.
- 5 - Identificación excelente.

- Factibilidad de la identificación de la fístula por esofagoscopia,

Esta variable sólo se valoraba si era una fístula esófago-traqueal o esófago-bronquial.

- 0 - Identificación imposible.
- 1 - Identificación casi imposible.
- 2 - Identificación difícil de realizar, es preferible usar otros métodos.
- 3 - Identificación posible con algunas carencias.
- 4 - Identificación fácil de realizar.
- 5 - Identificación excelente.

- Factibilidad de la identificación de la fístula en la cavidad pleural.

Sólo se puntuaba esta variable si existía una torascotomía abierta.

- 0 - Identificación imposible.
- 1 - Identificación casi imposible.
- 2 - Identificación difícil de realizar, es preferible usar otros métodos.
- 3 - Identificación posible con algunas carencias.
- 4 - Identificación fácil de realizar.
- 5 - Identificación excelente.

- Factibilidad de la aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fístula, intraluminal o intersticial.

Idealmente, si era posible, se hacía en ambos espacios de forma simultánea.

- 0 -Ejecución imposible.
- 1 - Ejecución casi imposible.
- 2 - Difícil de usar, utilizable si no existen alternativas.
- 3 - Posible con algunas incidencias graves en la ejecución.
- 4 - Fácil de realizar.
- 5 - Excelente.

- Factibilidad de bloqueo de la fístula con la matriz de fibrina enriquecida con ASCs.

- 0 - Ejecución imposible.
- 1 - Ejecución casi imposible.
- 2 - Difícil de usar, utilizable si no existen alternativas.
- 3 - Posible con algunas incidencias graves en la ejecución.
- 4 - Fácil de realizar.
- 5 - Excelente.

2. Variables secundarias

a. Complejidad del procedimiento

Para estimar ésta variable se recogieron los siguientes parámetros:

- El tiempo quirúrgico de cada paso crítico en concreto, medido en minutos.

Es el tiempo desde el inicio de cada paso hasta su finalización, no incluye los tiempos de la inducción anestésica, tampoco del despertar ni de la realización de la broncoscopia rígida, de la esofagoscopia rígida o de la toracoscopia.

- Dificultades instrumentales, estimadas con la siguiente escala:

- 0 -Instrumentos muy mal adaptados que hacen la aplicación imposible.

- 1 - Instrumentos mal adaptados que hacen la aplicación casi imposible.
- 2 - Instrumentos difíciles de usar, pero utilizables si no existen alternativas.
- 3 - Instrumentos que necesitarían rediseñarse para mejorar su ejecución.
- 4 - Instrumentos fáciles de utilizar.
- 5 - Instrumentos perfectamente adaptados.

- **Dificultades anestésicas** derivadas de la presencia de la fistula, que pudieron ser de dos tipos:

- Dificultades de ventilación por pérdidas aéreas a través de la fistula.
 - 0 - ninguna.
 - 1 - si.
- Dificultades encontradas para evitar el riesgo de aspiraciones pulmonares.
 - 0 - ninguna.
 - 1 - si.

b. Seguridad del procedimiento

Para estimar esta variable se registraron los efectos adversos farmacológicos y quirúrgicos y las complicaciones intraoperatorias: las ocurridas en el postoperatorio inmediato (definido como los 30 días siguientes al procedimiento quirúrgico) o a largo plazo (dentro del primer año).

Complicaciones intraoperatorias, fueron graduadas con la siguiente escala:

- 0 - no hubo ninguna.
- 1 - leves, alteraciones de las constantes o complicaciones que se controlaron o autocontrolaron sin requerir actuación terapéutica.
- 2 - Menos graves, alteraciones de las constantes o complicaciones que precisaron de una actuación terapéutica para su corrección.
- 3 - Graves, alteración de las constantes o complicaciones vitales que pusieron en riesgo la vida del paciente.
- 4 - Muy graves, alteración de las constantes o complicaciones que obligaron a interrumpir el procedimiento.
- 5 - Éxito durante la realización del procedimiento.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Complicaciones postoperatorias. Para la graduación de las complicaciones quirúrgicas postoperatorias tempranas o tardías se utilizó la clasificación de Clavien-Dindo¹¹⁶ (tabla 1):

Tabla 1.- Clasificación de complicaciones quirúrgicas de Clavien-Dindo

Grados de complicación	Definición
Grado I	Cualquier desviación del curso normal del postoperatorio sin la necesidad de emplear tratamiento farmacológico o quirúrgico o endoscópico o radiología intervencionista. Son considerados regímenes terapéuticos aceptables los siguientes: fármacos antieméticos, antipiréticos, analgésicos, diuréticos, sueroterapia, fisioterapia y psicoterapia. En este primer grado se incluyen las dehiscencias o infecciones de heridas tratadas a pie de cama
Grado II	Cualquier tratamiento farmacológico con drogas no incluidas en el primer apartado. Las transfusiones de hemoderivados y la nutrición parenteral se incluyen también aquí.
Grado III	Intervenciones radiológicas, endoscópicas o quirúrgicas
Grado III-a	Intervenciones sin necesidad de anestesia general
Grado III-b	Intervenciones que precisan de anestesia general
Grado IV	Complicación vital que requiere ingreso en CI/UCI*. Se incluyen también las complicaciones de SNC**
Grado IV-a	Disfunción de un solo órgano (incluyendo diálisis)
Grado IV-b	Disfunción multiorgánica
Grado V	Éxito
Sufijo “d”	Si el paciente todavía sufre de la complicación en el momento del alta, se añade el sufijo “d” (por discapacidad) al grado de complicación. Esta letra alerta sobre la necesidad de hacer un seguimiento de la

complicación hasta su resolución.

* CI: cuidados intermedios; UCI: unidad de cuidados intensivos. ** Hemorragia cerebral, ictus, hemorragia subaracnoidea, se excluyen los accidentes isquémicos transitorios (TIA)

Aunque el paciente pasó por dos procedimientos, primero la lipoaspiración para la extracción de la fracción vásculo-estromal y, segundo, la implantación de las células troncales en el tejido diana, la fístula, ambos procesos se evaluaron de forma conjunta debido a la dificultad metodológica de distinguir entre las complicaciones derivadas de una u otra actuación. No obstante, cuando la complicación estuvo claramente vinculada a un procedimiento, se registró esta asociación causal.

Efectos adversos

Para control de los efectos adversos se monitorizaron los síntomas de una forma sistemática al menos en la visita basal, al mes de la intervención, a los tres meses y al año. Los síntomas se evaluaron de acuerdo a las siguientes escalas:

- Graduación para la tos:
 - 0 - ausente.
 - 1 - leve, fácilmente tolerable.
 - 2 - moderada interrumpe algunas actividades.
 - 3 - intensa, interrumpe ocasionalmente actividades como andar o dormir.
 - 4 - muy grave es intolerable causa disnea, vómitos.
- Graduación de la expectoración, estimado de acuerdo al volumen de expectoración recogido en 24 horas en un vaso de 50 ml:
 - 0 - ausente.
 - 1 - leve, expectora algo.
 - 2 - expectoración moderada (< de 20 ml).
 - 3 - expectoración grave (> de 20 ml).
 - 4 - muy grave (> 100 ml).
- Tipo de expectoración, registrada como solo dos ítems:
 - 0 - blanquecina.
 - 1 - purulenta.

- Hemoptisis graduada con la siguiente escala:
 - 0 - ausente.
 - 1 - leve, algún esputo esporádico.
 - 2 - moderada, hemoptisis diaria de varios esputos.
 - 3 - grave, con expectoración abundante de sangre.
 - 4 - muy grave, masiva > 600 ml de sangre, vital.
- El dolor se localizó y se graduó con la siguiente escala:
 - 0 - ausente.
 - 1 - leve, fácilmente tolerable.
 - 2 - moderado, ocasionalmente necesita un analgésico
 - 3 - grave, precisa de uno o más analgésicos pautados
 - 4 - muy grave, precisa de mórficos;
- La disnea : (Escala MRC adaptada de la publicadada por Stenon¹¹⁷)
 - 0 - ausencia de disnea
 - 1 - disnea con la marcha rápida de más de un piso
 - 2 - disnea al andar en llano de menos de un piso
 - 3 - disnea al andar en llano de menos de 100 mts
 - 4 - disnea de mínimos esfuerzos con el habla
- Astenia: 0 no, 1 si.
- Anorexia: 0 no, 1 si.
- Pérdida de peso: 0 no, 1 si, cuantía en kg.
- Karnofsky¹¹⁸:
 - 100% actividad normal asintomático, sin evidencia de enfermedad.
 - 90% actividad normal y síntomas mínimos.
 - 80% actividad normal con esfuerzo y algunos síntomas.
 - 70% incapaz de trabajar cuida por si mismo.
 - 60% necesita cuidados ocasionales.
 - 50% necesita considerables cuidados y asistencia médica.
 - 40% gravemente disminuido necesita hospitalización.
 - 30% totalmente incapaz, hospitalizado con cuidados médicos especiales.
 - 20% muy enfermo ingresado con soporte médico avanzado.

10% moribundo.

0% éxitus.

Una elevación en 1 punto en los síntomas graduados 0 o 1 o de 2 puntos o más en los síntomas graduados en una escala de cinco puntos, cuando se compare con la visita cero se considera un efecto adverso.

Los efectos adversos se clasificaron por su trascendencia en (modificado de la clasificación de reacciones adversas a medicamentos)¹¹⁹:

1 Leve: no causa limitación de las actividades habituales y no se necesita instaurar un tratamiento nuevo para tratar el acontecimiento adverso.

2 Moderado: causa alguna limitación de las actividades habituales, o implica instaurar un tratamiento nuevo para tratar el acontecimiento adverso.

3 Grave: causa imposibilidad de realizar las actividades habituales o requiere la suspensión definitiva del fármaco responsable.

Se definió la causalidad del efecto adverso con la siguiente escala

1 Definitiva: la reacción aparece con una secuencia temporal razonable tras la administración de las células troncales. El efecto ya había sido referido previamente o es una respuesta esperada para el fármaco en estudio, confirmándose una mejoría tras la disminución o suspensión del fármaco y una reaparición del efecto tras la readministración del mismo, sin existir otra alternativa etiológica aparente.

2 Probable: la reacción aparece con una secuencia temporal razonable tras la administración del fármaco. El efecto ya había sido referido previamente o es una respuesta esperada para el fármaco del estudio. Se produce una mejoría tras la reducción o suspensión del tratamiento, y cualquier otra etiología es improbable o menos probable. No es necesaria información sobre la reexposición.

3 Posible: la reacción aparece con una secuencia temporal razonable tras la administración del fármaco. El efecto ya había sido referido previamente o es una respuesta esperada para el fármaco en estudio. Existe una posible alternativa etiológica que puede ser

responsable de la RAM. No es necesaria información sobre la suspensión del fármaco o ésta puede no ser clara.

4 Improbable/dudosa: la reacción no aparece con una secuencia temporal tras la administración del fármaco, o si existe, ésta es remota. El efecto no es una respuesta esperada, ni conocida para el fármaco en estudio. Hay una posible alternativa etiológica que puede ser responsable de la RAM.

5 No relacionada: la RAM se debe a una enfermedad subyacente o concurrente o al efecto de otro fármaco, y no cumple ninguna de las definiciones anteriores.

d. Características de la fístula

Se anotó el tipo, localización, tamaño, duración y tratamientos previos.

e. Efectividad del tratamiento

Para estimar esta variable se midieron las siguientes items:

Eficacia del procedimiento para lograr el cierre de la fístula. Graduación del cierre de la fístula de acuerdo a la siguiente escala:

- 0 - Ninguno, la fístula no experimenta cambios.
- 1 - Reducción en su tamaño inferior al 50%.
- 2 - Reducción en su tamaño superior al 50%.
- 3 - Reducción en su tamaño superior al 75%.
- 4 - Reducción en su tamaño superior al 90%.
- 5 - Cierre completo del 100%.

Para realizar la medición del grado de cierre de la fístula se tomó como referencia el tamaño de la misma en broncoscopia antes de su tratamiento en la visita 0. Para realizar las mediciones del tamaño de la fístula se comparó esta con el tamaño de la punta del broncoscopio, que mide 5 mm de diámetro, o con las pinzas de biopsia bronquial abiertas, que miden 6 mm, tomándose siempre el diámetro mayor. El grado 5 o cierre completo se alcanza cuando se observa un cierre del 100% en algún punto del trayecto con epitelización íntegra de la luz.

I. Metodología de las distintas fases

1. Estudios clínicos preimplantación de células

- Previo al tratamiento, el cirujano responsable elaboró su historia médica completa mediante: exploración física, datos antropométricos, signos vitales (tensión arterial, temperatura, frecuencia cardíaca), análisis de sangre y evaluación de la fístula siempre mediante una broncoscopia y un TAC. Dependiendo del tipo de fístula se contempló también la realización de esofagoscopia y pleuroscopia.
- Se informó detenidamente al paciente del estudio y se solicitó su firma en la hoja de Consentimiento Informado.
- El paciente fue examinado por el servicio de anestesia de nuestro hospital, el cual se encargó de aplicar la sedación o la anestesia general durante las intervenciones que se realizaron a lo largo del tratamiento.
- Se realizó el análisis individual de las características de la fístula para planificar el procedimiento endoscópico más apropiado a cada una, logrando así la máxima adecuación de la técnica al paciente.

2. Extracción de la fracción vículo-estromal

a. Lipoaspirado

- El tratamiento comenzó mediante una liposucción, bajo anestesia local (mepivacaina al 1%; Scandibsa™, Inibsa, Barcelona, España) y/o sedación, realizada por el servicio de cirugía plástica del HULP.
- Para la liposucción se utilizaron aguja-cánulas metálicas de lipoaspiración de 3G (figura 18) introducidas en tejido subcutáneo de la pared abdominal, en los flancos o en los muslos, a través de una o varias pequeñas incisiones en la piel de de aproximadamente 5 mm de diámetro. La elección exacta del lugar donde hacer la lipoaspiración se dejó a criterio del cirujano plástico, este normalmente repetía la lipoaspiración en ambos lados para mantener la estética del paciente. Sobre las cánulas se aplicó una aspiración manual ejercida con una jeringa de 50 ml (figura 33-34). La cánula se movió por la zona elegida por el cirujano plástico haciendo un gesto de raspado del tejido adiposo que permitía la ruptura de la mecánica del mismo y su extracción (figura 35). Previamente en la zona donde

III. MATERIAL Y MÉTODOS

se iba a realizar el lipoaspirado para minimizar las perdidas hemáticas se había inyectado una solución salina con epinefrina como vasoconstrictor.

Figura 33- Material quirúrgico para la lipoaspiración

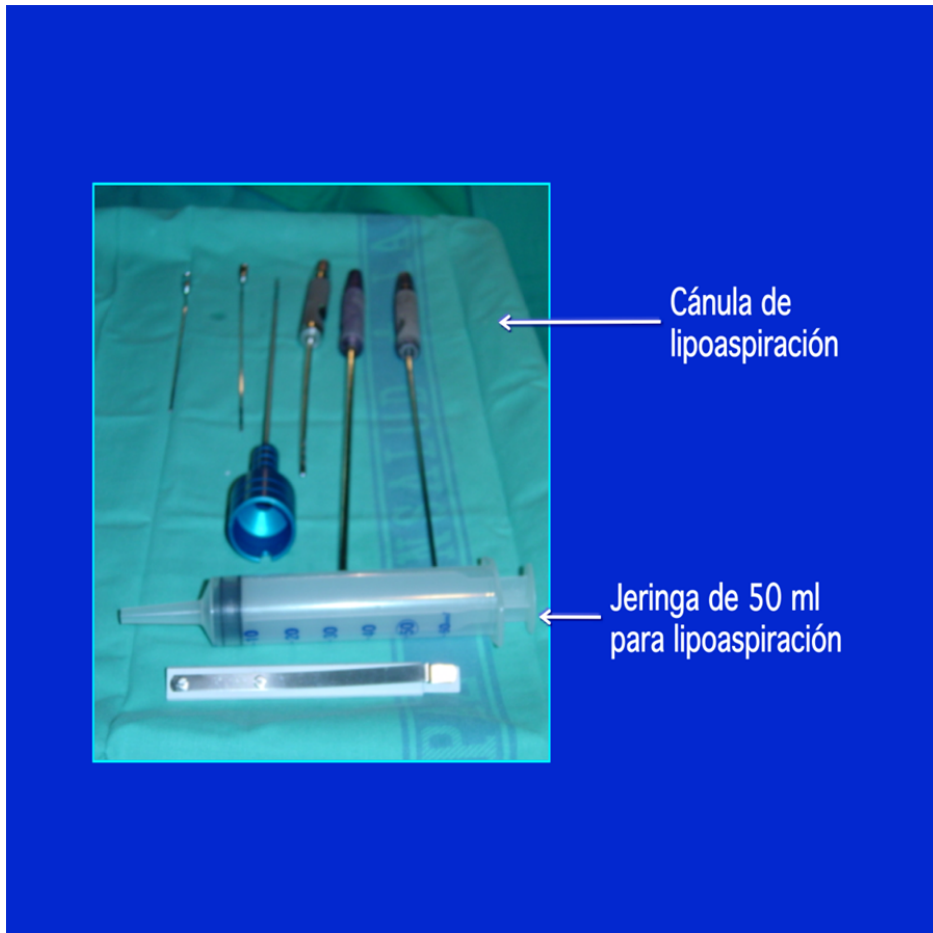
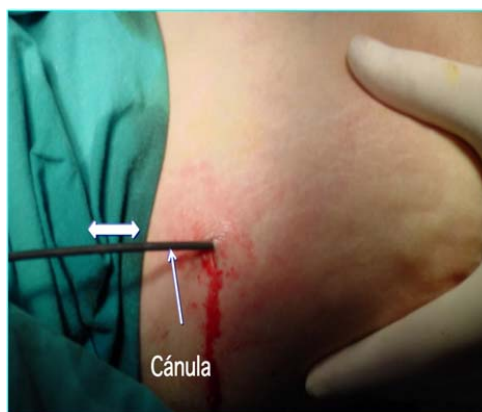


Figura 34.- La jeringa de 50 ml adaptada a la aguja-cánula



Figura 35.- Técnica quirúrgica de lipoaspirado



La cánula se avanza y se retira en movimientos de ruptura mecánica del tejido adiposo subcutáneo.

Figura 36.- Lipoaspirado



b. Procesado del lipoaspirado en el laboratorio de terapia celular

La grasa obtenida, entre 80-250 ml (figura 36), fue procesada para obtener las células troncales adultas mesenquimales existentes en la fracción vásculo-estromal según la técnica descrita por Zuk⁸³ y siguiendo el protocolo desarrollado en nuestro hospital por el laboratorio de terapia celular. Este proceso consistió en: 1º- lavado del lipoaspirado con volúmenes iguales de suero salino tamponado con fosfato; 2º- agitación manual y centrifugación a 300g/10 min; 3º- eliminación mediante una pipeta de los hematíes, la solución salina y los anestésicos locales; 4º- digestión enzimática de la matriz extracelular, con Colagenasa tipo I (GIBCO BRL) a una concentración en 0,075% durante 30 minutos a 37°C, para liberar la fracción celular del lipoaspirado; 5º- inactivación de la colagenasa con FBS (10 ml/tubo); 6º- centrifugación del tejido disgregado durante 10 minutos a 250 g y temperatura ambiente; 7º - lavado de nuevo de la bolita celular obtenida añadiendo 0,16 moles de Cloruro Amónico (NH₄Cl) para producir la lisis de los eritrocitos remanentes, manteniendo con esta solución durante 10 minutos a temperatura ambiente; 8º- tras nuevo lavado y centrifugado a 250 g durante otros 10 minutos se obtuvo un precipitado que consistía en la fracción vásculo-estromal. La solución tamponada de fosfato se usó de nuevo para lavar el producto obtenido y se filtró a través de una malla de nylon con poros de 70 µm. Se hizo un conteo de células viables mediante el ensayo de exclusión de azul tripán. Finalmente las células fueron suspendidas para su traslado a quirófano en 2 ml de solución de

Ringer lactado, De este volumen celular sólo un 1,5-5 % son células troncales mesenquimales, el resto son células de muy diferentes tipos. Todo el proceso de obtención de la fracción vasculo-estromal se realizó en condiciones máximas de asepsia en cabinas de flujo laminar.

c. Controles de bioseguridad, caracterización, y diferenciación celular

Una parte de la grasa inicial se quedó en el Laboratorio de Terapia celular de la Unidad de Investigación de nuestro hospital, para ser utilizada en diferentes estudios de bioseguridad celular y estudios preclínicos para el tratamiento de nuevas patologías. Las células obtenidas pudieron ser cedidas por el laboratorio a otras instituciones con las que colaboraba para análisis relacionados con los estudios anteriormente indicados, salvo que el paciente no permitiera esas cesiones.

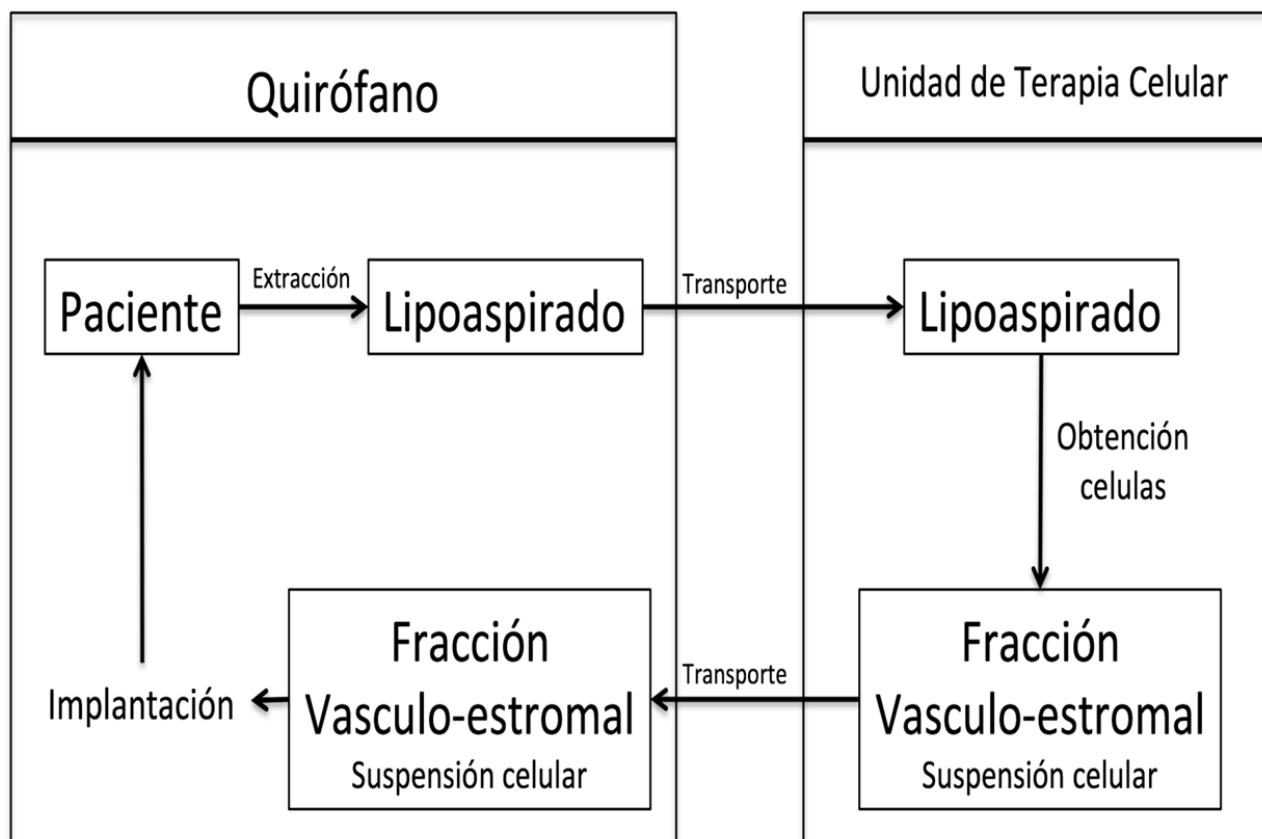
Un 10% de las células aisladas se separó para realizar estudios de crecimiento y caracterización de las células. Para su caracterización las células fueron colocadas en medios de cultivo estándar (medio Eagle con modificación de Dulbecco + 10% de suero de feto bovino + 1% de penicilina/estreptomicina) con una densidad de 5000 células/cm, a 37°C bajo 5% de CO₂ durante siete días. El medio de cultivo se cambió entre las 24-96 horas. Después de ese proceso las células que mostraban adherencia a la placa fueron caracterizadas por citometría de flujo. Se confirmó su naturaleza troncal diferenciándolas a dos tejidos diferentes, adipocitos y a osteoblastos.

3. Aplicación de las células troncales mesénquimales

La aplicación directa de la fracción vasculo-estromal

Se consideró la forma más sencilla de utilización de las células troncales, que permitiría tratar la mayoría de la patología fistulosa. Por tanto, se escogió la aplicación directa como método básico para su empleo por defecto en el grueso de las fístulas. Las tres etapas de procedimiento: la lipoaspiración, el procesamiento de la fracción vasculo-estromal y la aplicación se realizaron en la misma jornada, entre la lipoaspiración y el implante de la fracción vasculo-estromal no transcurrieron más de 4 horas (figura 37).

Figura 37.- Diagrama general de la obtención de la fracción vasculo-estromal y su aplicación directa en el paciente



El paciente se lleva a quirófano, donde se extrae el lipoaspirado. Este se transporta a la unidad de terapia celular, donde en una campana de flujo laminar se procesa el lipoaspirado para obtener la fracción vasculo-estromal que se transporta de nuevo a quirófano para hacer la implantación en el paciente. El paciente entre los dos procedimientos ha permanecido en la Unidad de Reanimación. En total en completar el circuito desde la lipoaspiración y el implante de la fracción vasculo-estromal no transcurrieron más de 4 horas.

La aplicación diferida tras expansión celular

En este caso después de la extracción de la fracción vasculo-estromal, esta se envía a un laboratorio de producción celular. En este, se cultivan las células troncales, con calidad clínica, en medios celulares durante varias semanas hasta alcanzar dosis de entre 20-40 millones de células troncales. Este tratamiento se reserva para la patología fistulosa más compleja; las fistulas de la vía aérea con el esófago. En caso de ser necesario un segundo o un tercer tratamiento la dosis inicial si es de 20 millones se puede doblar sin superar nunca la dosis de 40.000.

La expansión de las células troncales se llevo a cabo por la empresa de bioingeniería titular Cellerix especializada en terapia regenerativa. El método de expansión no se puede recoger aquí por estar sometido a proceso de adquisición de patente por parte de la empresa referida. Al dejar de operar esta empresa se la sustituyo en el último paciente por el laboratorio de producción celular del Hospital Ramón y Cajal.

4. Implantación de las células troncales mesenquimales y bloqueo de la fistula, diseño de la técnica quirúrgica endoscópica

Diseño esencial o crítico de la técnica quirúrgica endoscópica

El fin de la técnica fue alcanzar dos objetivos: la aplicación de las células y el bloqueo de la fistula.

El primer objetivo de la técnica fue lograr la aplicación en el trayecto fistuloso de las células troncales mesenquimales ASCs, bien de forma directa con la fracción vículo-estromal o expandidas tras cultivo durante varias semanas, para que estas pudiesen ejercer su acción beneficiosa. Para lograr el trasplante de las células troncales al tejido diana, es decir, a la fistula, el proceso quirúrgico se desglosó en los siguientes pasos:

1. Obtención de células troncales mesénquimales en una cuantía superior a 2 millones de células en la fracción vículo-estromal o entre 20-40 millones si se someten a expansión celular en cultivo.
2. Identificación de la fistula por broncoscopia.
3. Identificación de la fistula por esofagoscopia si era una fistula esófago-traqueal o esófago-bronquial.
4. Identificación de la fistula en la cavidad pleural si era una fistula bronco-pleural y existía una torascotomía abierta.
5. Aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fistula, intraluminal o intersticial, de la forma más homogénea posible, idealmente en ambos espacios de forma simultánea. Para la aplicación intersticial o intraluminal de las ASCs se podían utilizar cualquiera de las vías: bronquial, esofágica o pleural. El acceso combinado desde los dos lados se considero óptimo. Para la aplicación intersticial las células troncales ASCs se suspendieron en suero salino. A la aplicación intersticial se le dió el valor 1, a la intraluminal el valor 2 y a la aplicación combinada el valor 3.

6. Bloqueo de la luz de la fistula con Tissucol Duo 2 ml.

Además del trasplante de las células troncales ASCs a la fistula, también se juzgó que era necesario lograr un bloqueo del trayecto fistuloso, considerado como segundo objetivo. Basándonos en los criterios ya comentados y los resultados experimentales preclínicos realizados con el sellador de fibrina humana, Tissucol Duo 2 ml, se había seleccionado esta cola biológica como la matriz más adecuada para lograr ese propósito. Las virtudes que poseía este polímero de fibrina humana la hacían ideal para alcanzar el objetivo propuesto. Además de ser muy maleable, se adaptaba muy bien al contorno de la fistula (al fraguar en la luz de la fistula se conformaba con las dimensiones de la misma), permitiendo vehicular en la fracción de trombina las células troncales. Al unirse la trombina con el fibrinógeno se desencadenaba la polimerización que lleva a la formación de la malla de fibrina. Las células troncales quedan así incluidas y distribuidas de forma uniforme a lo largo de toda la matriz de fibrina.

Estos seis pasos fueron definidos como críticos. Es decir, si cualquiera de ellos no fueran factibles, con una puntuación de 2 o menos, sería necesario rechazar la hipótesis principal.

Proceso de validación del diseño esencial y de modificación o perfeccionamiento del mismo

Es un proceso iterativo de repetición cronológica en los sucesivos pacientes de la técnica diseñada incluyendo las modificaciones o nuevos pasos implementados para llegar a una optimización de la misma o un rechazo de la hipótesis principal. Se aplicó el siguiente algoritmo de validación/modificación, que consta de las siguientes fases:

Planificación:

Antes de cada evento o ensayo en un paciente concreto, se analizaron las características de la fistula y se definieron a priori de forma pormenorizada como se iban a ejecutar los seis pasos críticos en ese paciente. Como consecuencia de esta adaptación de los seis pasos críticos a las particularidades de cada fistula se podían modificar las técnicas de cada escalón para lograr su mejor ejecución. Si no se lograba hacer esa traslación de los pasos al paciente también se rechazaría la hipótesis principal. Así mismo, de forma razonada se podían introducir pasos nuevos, que serían evaluados de la misma forma que los críticos. Se asignaron los valores 1 si se aplicó la técnica quirúrgica sin modificaciones, 2 si se modificó la técnica para adaptarlas a las

características de la fistula y 3 si como consecuencia de ese análisis se introdujo un paso nuevo. Si no procedía la aplicación del paso 2 o 3 por el tipo de fistula, se le asignó el valor de 0.

Factibilidad:

Valoración de la ejecución de cada uno de los pasos planificados de acuerdo a las escalas de factibilidad definidas.

Complejidad del procedimiento:

Valoración de la complejidad ejecución de cada uno de los pasos planificados de acuerdo a las escalas de complejidad definidas.

Análisis de los resultados de la ejecución:

Como consecuencia del análisis de los resultados si se dieron valores en la factibilidad de cualquiera de los pasos críticos iguales o inferiores a 2, la técnica se consideraba inviable y se aceptaba la hipótesis nula.

Si los valores de factibilidad fueron 3 se buscaba una solución que corrigiera y mejorara esta mala ejecución. El análisis implicaba identificar la causa de la mala realización. Si no se encontraba un cambio en la técnica que subsanara el déficit se aceptaba la hipótesis nula.

Cuando el tiempo quirúrgico de cualquiera de los pasos, ya fuera uno de los 6 PC o PN superaba los 60 minutos se aceptaba la hipótesis nula. Si se dieron dificultades instrumentales 0-2 se rechazaba la hipótesis principal. Si fueron 4-5 se aceptaba la hipótesis. Si el valor fue 3 se buscaba una solución, que de no encontrarse aceptaba la hipótesis nula, si se encontraba se ponía en práctica en el siguiente ensayo.

Así mismo, si en las complicaciones intraoperatorias o postoperatorias se daban puntuaciones iguales o superiores a 3 se aceptaba la hipótesis nula y terminaba el proceso de ensayo, si la relación causal fuera definitiva o probable, valores 1 o 2. Lo mismo implicaba la aparición de efectos adversos graves; se consideraba aceptada la hipótesis nula si la relación causal era definitiva o probable.

Si la efectividad del tratamiento era cero, es decir, si se daba un fallo de cura, mediante un análisis comparativo con los casos previos se proponía una acción correctora (ver siguiente punto). De no poderse identificar el error también se consideraba rechazada la hipótesis

principal. Si los cambios introducidos (modificación de pasos o críticos o introducción de pasos nuevos) para solventar el fallo de cura no funcionaban en los siguientes ensayos (fistulas) también se aceptaba la hipótesis nula, es decir, si la efectividad seguía siendo cero se descartaba la hipótesis principal, que se aceptaba en caso de mejora de la efectividad.

Propuestas de perfeccionamiento a través de la modificación de los pasos críticos o de introducción de pasos nuevos:

En los dos supuesto de que se daba un fallo de factibilidad grado 3 o un fallo de efectividad grado 0 se tenía que concretar en una propuesta de modificación de los pasos críticos o implementar la técnica quirúrgica endoscópica con nuevos escalones que llevasen a mejorar la factibilidad y la efectividad. Tanto la modificación como la implementación de nuevos pasos se ensayaban en los siguientes pacientes. Si en estos fracasaban, se daban puntuaciones de cero y se aceptaba la hipótesis nula.

5. Metodología de los pasos esenciales o críticos

a. Procedimiento endoscópico y anestesia

- Abordaje endoscópico de la fistula. Cuando esta comunicaba dos espacios y el acceso a los mismos era posible, la aproximación fue doble mediante la utilización endoscópica de dos vías, bronquial y pleural en las fistulas bronco-pleurales, bronquial y esofágica en las fistulas traqueo-esofágicas o bronco-esofágicas.
- El abordaje de la vía aérea se hizo mediante una broncoscopia rígida con ventilación en jet de baja frecuencia. El broncoscopio rígido empleado fue el broncoscopio rígido diseñado por Harrell-Dumon de la casa Efer-Dumon. A su través se usó un broncosfibroscopio terapéutico Olympus o un videobroncoscopio EVIS EXERA también de la casa Olympus modelo BF-1T160 de 6.0 mm de la gama terapéutica para el abordaje de los bronquios. Para el acceso al esófago se utilizó el esofagoscopio rígido también de la empresa Efer-Dumon, a través del cual se paso el videobroncoscopio EVIS EXERA de la casa Olympus. Se dispuso también por si fuera necesario de un endoscopio de digestivo de la marca Olympus. Para el abordaje de la cavidad pleural por video endoscopia se utilizó una óptica recta de 30ª grados de 10 mm Storz, conectada a un sistema de video de la misma casa.

- La anestesia fue vía intravenosa, con remifentanilo y propofol en ventilación espontánea con ventilación en jet de baja frecuencia en los momentos precisos, empleándose el dispositivo Manujet III.
- La posición del paciente en la mesa de quirófano variaba según las necesidades del paciente y las del cirujano para abordar la fístula. Cuando existía riesgo de aspiración de contenido digestivo por la existencia de una fístula esofago-traqueal el paciente fue colocado en decúbito supino en posición anti-Trendelenburg. Cuando se abordó la fístula bronco-pleural y existía toracostomía abierta, se colocó al paciente en decúbito supino y posteriormente en decúbito lateral.

b. Aplicación de las células troncales mesenquimales derivadas de la grasa

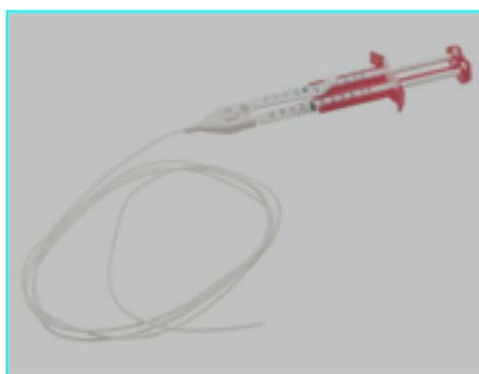
- Para la aplicación intersticial de las ASCs, ya fuera desde cualquiera de los lados, bronquial, esofágico o pleura se utilizaron agujas de esclerosis esofágicas, agujas de 23 G (0,6 mm) de 5 mm de longitud montadas en un catéter de 2,8 mm de diámetro y 1650 mm de longitud.
- La vehiculación de las ASCs se llevó a cabo de dos formas, suspendidas en 2-4 ml de Ringer lactato cuando se aplicaron intersticialmente y suspendidas en el segundo componente de Tissucol Duo, el que contiene la fracción de trombina, cuando se aplicaron intraluminalmente.
- Tanto para el bloqueo de la fístula como para la aplicación intraluminal de las ASCs se empleó Tissucol Duo 2 ml. Este adhesivo de fibrina cumplía así dos funciones, bloquear la luz del trayecto fistuloso y hacer de matriz transportadora de las células troncales al tejido diana. Cuando se realizó la aplicación intersticial e intraluminal de las células troncales, se hizo una repartición de la dosis de células aplicadas entre las dos vías, intersticial e intraluminal. Cuando sólo se utilizó una vía, la mitad de la dosis se aplicó en suspensión en Tissucol y la otra parte se separó igualmente para realizar los estudios de control celular.
- El Tissucol Duo 2 ml, producto de la compañía farmacológica Baxter, es una cola de fibrina biológica compuesta de dos componentes, un componente con fibrina humana, obtenida de plasma humano, y un segundo componente que es la trombina. Al unirse los dos componentes reproducen la cascada de la coagulación, creándose una maya de fibrina

III. MATERIAL Y MÉTODOS

a partir del fibrinogeno al reaccionar con la trombina. El Tissucol Duo 2 ml se presenta en dos viales congelados. El producto debe de mantenerse congelado a temperaturas inferiores a 18°C. Para su aplicación clínica debe restituirse primero a temperatura ambiente colócalo en un baño María. Una vez restituido se puede usar en la próximas 48 horas. La composición de los dos componentes es la siguiente: Primer componente, solución de Tissucol: fibrinógeno humano 90 mg/ml, fibronectina 5,5 mr/ml, plaminógeno 0,8 mg/ml, factor XIII 30 U/ml, aprotinina (inhibidor de la fibrinolisis sintético) 3000 u/ml. Escipientes: albúmina humana, glicina humana, polysorbato 80, nitrato sódico, creatina, cloruro sódico y agua para inyección. Segundo componente, solución de trombina: contiene trombina humana 500 UI/ml disuelta en una solución de cloruro de calcio (CaCl₂).

- Cada uno de los componentes viene cargado en una jeringa de 2 ml. Las dos jeringas se montan en paralelo en un sistema de nombre Duplojet. Este sistema tiene un embolo común que garantiza la aplicación simultánea de volúmenes iguales de cada uno de los dos componentes. Los dos componentes se unen y mezclan antes de su liberación por medio de una boquilla común a cuyo extremo se adapta una aguja sencilla.
- Para la aplicación del Tissucol Duo 2 ml a través del broncoscopio se utilizo en lugar de la boquilla común, el catéter Duplocath 180 también de la casa Baxter (figura 38)

Figura 38.- Dupocath 180



El catéter tiene una doble luz que permite llevar los dos componentes el fibrinogeno y la trombina sin mezclarse hasta la punta del mismo donde se unen permitiendo su liberación ya mezclados para que en el punto de aplicación se forme la malla de fibrina.

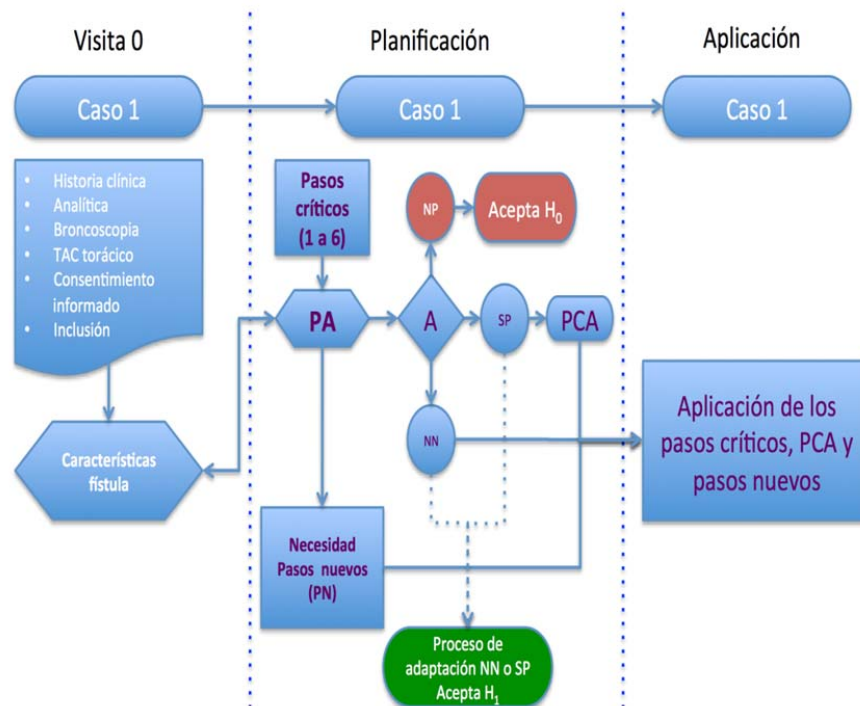
f. Metodología de los pasos modificados o implementados

- Para conseguir la ablación de la mucosa bronquial se empleó el electrocoagulador con argón-plasma de la casa ERBE ajustado a potencias de 40 vatios.
- Cuando fue posible el abordaje de la fístula desde el lado pleural para realizar la ablación del epitelio pleural, se usaron curetas estándar, con cucharilla de 5X3 mm.
- Para reducir el diámetro de la fístula y favorecer su bloqueo con Tissucol se utilizaban tres puntos de sutura trenzada reabsorbible de poliglactin 910 de 3/0 con aguja curva de medio cuarto (Vicryl®).

J. Análisis de las variables principal y secundarias para aceptar o rechazar la hipótesis principal

Con los algoritmos de planificación I y II, de factibilidad, de complejidad, de seguridad, de efectividad y de perfeccionamiento (figuras 39 a 45), se estableció *a priori* como sería el árbol de estimación de los resultados, de las variables para llegar a aceptar o rechazar la hipótesis principal. Al mismo tiempo se definió la secuencia en la que se ejecutarían las diferentes etapas del experimento. Este sería a la vez el árbol de realización, de análisis y de modificación, que llevaría al perfeccionamiento de la técnica quirúrgica endoscópica.

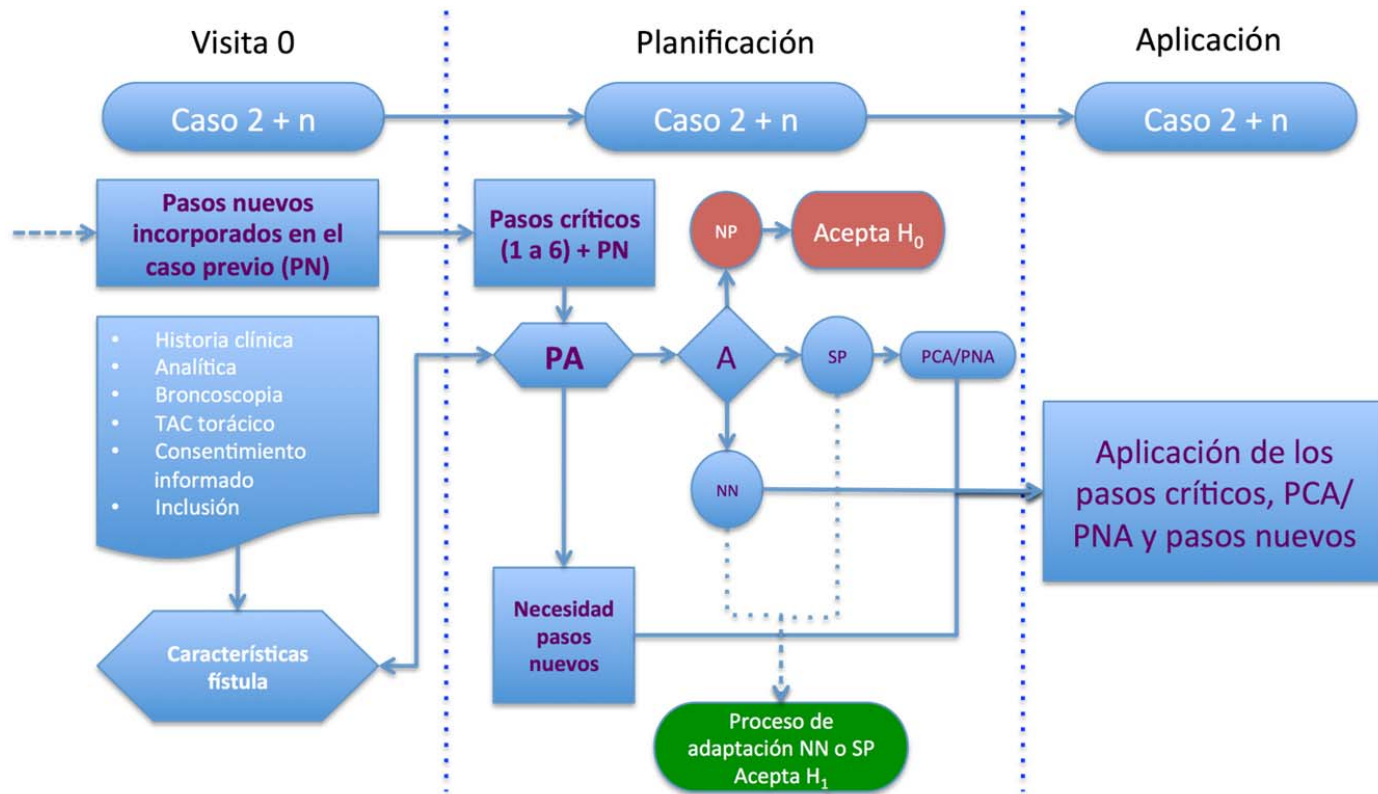
Figura 39.- Algoritmo I de planificación en el primer caso de la técnica quirúrgica endoscópica y aceptación H1 o H0



Las siglas usadas en el algoritmo de planificación corresponden a: A = adaptación; NN = no es necesaria; NP = no es posible; PA = proceso de adaptación; PCA = pasos críticos adaptados; SP = si es posible. Cuando el proceso de adaptación no es posible, valor NP se acepta H_0 . Si el proceso de adaptación de los pasos críticos no es necesario, valor NN, o si es posible, valor SP se acepta H_1 .

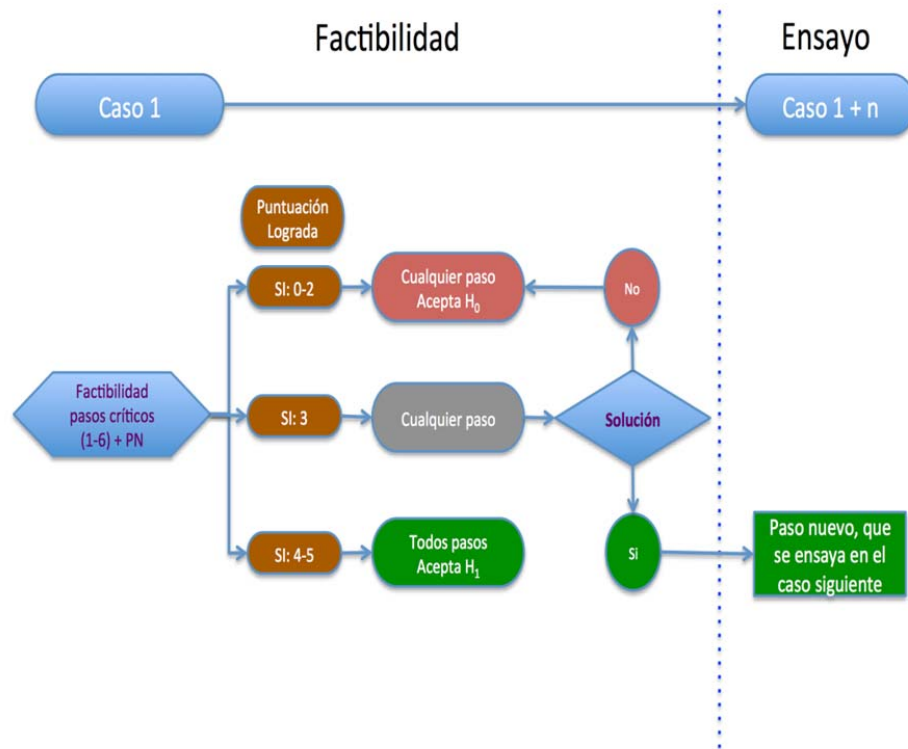
Figura 40.- Algoritmo II de planificación en el segundo caso y sucesivos de la técnica quirúrgica endoscópica y aceptación H_1 o H_0

III. MATERIAL Y MÉTODOS



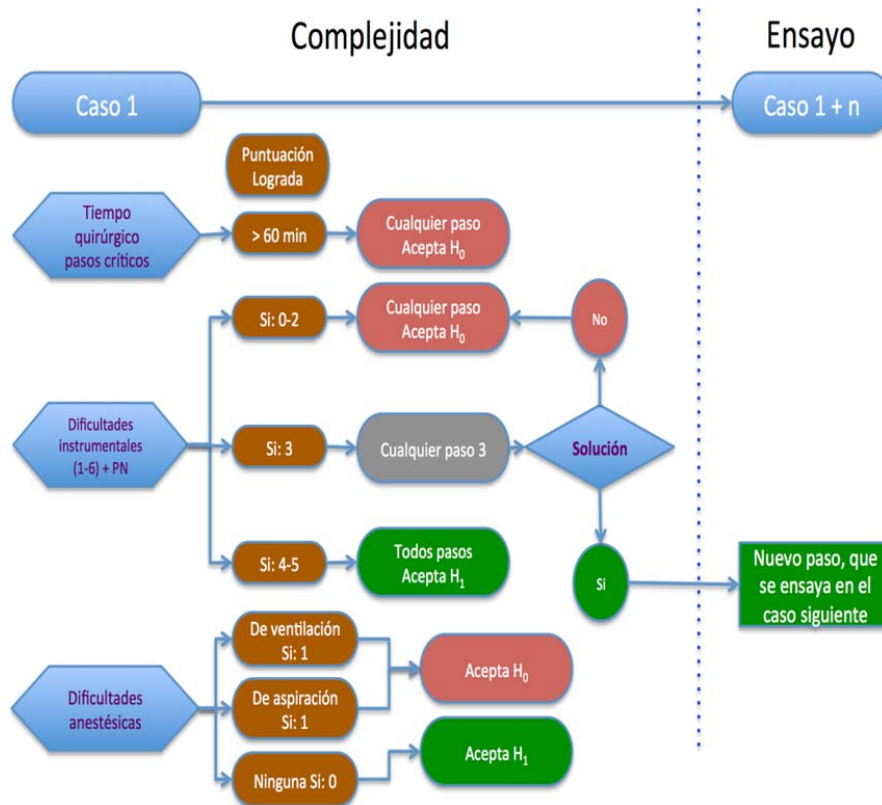
Las siglas usadas en el algoritmo de planificación corresponden a: A = adaptación; PA = proceso de adaptación; NN = no es necesaria; NP = no es posible; PCA = pasos críticos adaptados; PN = pasos nuevos introducidos en el caso previo; PNA pasos nuevos adaptados; SP = si es posible. Como en el algoritmo del primer caso, cuando el proceso de adaptación no es posible, valor NP se acepta H₀. Si el proceso de adaptación de los pasos críticos no es necesario, valor NN, o si es posible, valor SP se acepta H₁. La diferencia entre este II algoritmo de planificación y el I algoritmo de planificación es que este segundo incluye además del proceso de adaptación de los pasos críticos, también la de los pasos nuevos incorporados en el caso o en los casos previos.

Figura 41.- Algoritmo III de factibilidad de la técnica quirúrgica endoscópica y aceptación H1 o H2



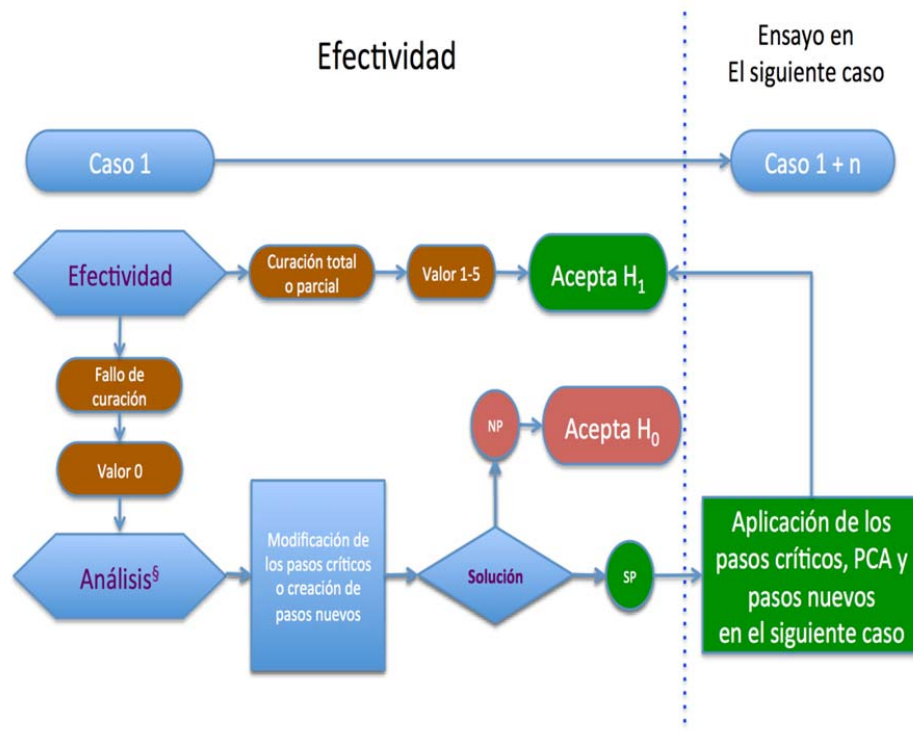
Las siglas usadas en el algoritmo de planificación corresponden a: PN = pasos nuevos introducidos en el caso previo. Si el valor de factibilidad es 0-2 en cualquiera de los pasos críticos o de los pasos nuevos (PN) se acepta H₀. Si el valor de factibilidad en cualquiera de los pasos, críticos o nuevos, es 3 se busca una solución. Si se encuentra se ensaya en el siguiente caso, si no es posible se acepta H₀. H₁ se confirma si los valores de factibilidad son 4-5 en todos los pasos o siendo 3 en alguno o varios de ellos se encuentra una solución.

Figura 42.- Algoritmo V de complejidad de la técnica quirúrgica endoscópica y aceptación H1 o H0



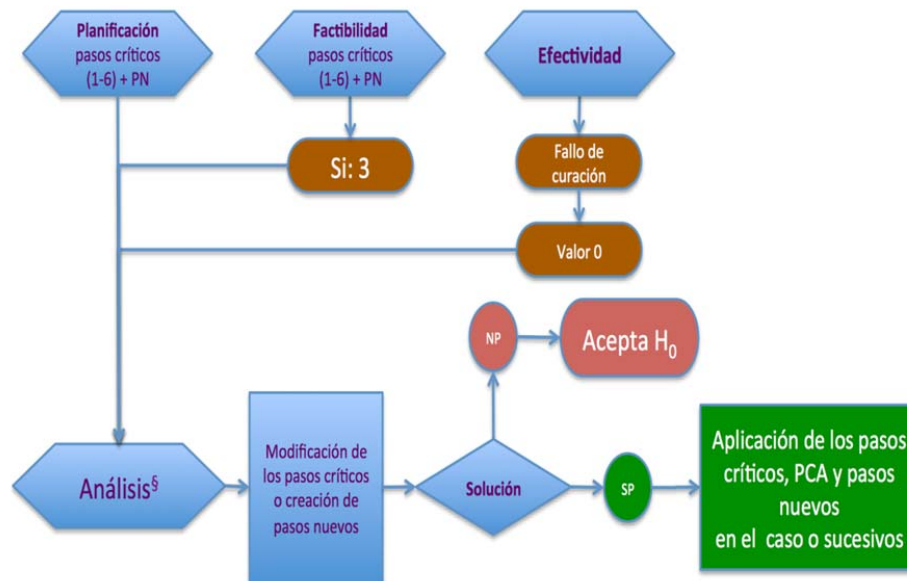
Si el tiempo quirúrgico de cualquiera de los pasos excede los 60 minutos se acepta H₀. Si se dan dificultades instrumentales de valor 0-2 se acepta H₀, si la dificultad es de grado 3, se busca una solución, de encontrarse se ensaya en el siguiente caso y acepta H₁, si no se encuentra se confirma H₀. Si no se dan dificultades instrumentales, valores 4-5 se acepta H₁. Si se dieran dificultades anestésicas en ventilación o en aspiración, valor 1 se acepta H₀, lo contrario lleva a validar H₁.

Figura 44.- Algoritmo VI de efectividad de la técnica quirúrgica endoscópica y aceptación H1 o H0



Las siglas usadas en el algoritmo de efectividad corresponden a NP = no es posible; SP = si es posible. Si hay un fallo de efectividad constatado en la primera revisión al mes, se hace un análisis comparativo[§] con los casos previos, para detectar donde puede estar la causa del diferente resultado. En concordancia con el análisis realizado se hacen modificaciones de los pasos críticos o se introducen pasos nuevos (PN), si la solución alcanzada es factible se acepta H1 y la solución encontrada se ensaya en el siguiente paciente. De no encontrarse la causa o la solución al fallo de curación se confirmaría H0.

Figura 45.- Algoritmo VII de perfeccionamiento de la técnica quirúrgica endoscópica y aceptación H1 o H0



En este algoritmo, se quiere resumir cuales son las causas que llevan a la elaboración de pasos nuevos, que permiten perfeccionar de forma gradual y progresiva la técnica quirúrgica. Esta necesidad viene dada para mejorar tres circunstancias: 1 La planificación, 2 La factibilidad y 3 El fallo de efectividad. § Si se da un fallo de efectividad, se hace un análisis comparativo con los casos previos, para detectar donde puede estar la causa del diferente resultado.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

A. Caracterización de las las células aplicadas a los pacientes:

Del 10% de las células apartadas, después de obtener la fracción vasculo-estromal, se hizo caracterización por citometría de flujo mostrando que las células eran positivas para CD29, CD44, CD90 y CD105, y negativas para CD11b, CD34, y CD133; permitiendo confirmar su fenotipo de MSCs. Además de su caracterización se sometieron a diferenciación en adipocitos y osteoblastos.

De las células sometidas a expansión por cultivo se caracterizaron y analizaron tanto fenotípica como genotípicamente, incluyendo cariotipo celular, demostrando que el 100% del producto celular producido para el tratamiento eran células troncales mesenquimales; además de descartarse contaminaciones bacterianas, fúngicas o virales.

B. Caso clínico número uno

1. Planificación

Paso 1 (obtención de las ASCs) no se modifico, valor 1.

Paso 2 (identificación de la fistula por broncoscopia) no se modifico, valor 1.

Paso 3 (identificación de la fistula por esofagoscopia) no procede, no se realizo, valor 0.

Paso 4 (identificación de la fistula en la cavidad pleural) no procede, no se realizo, valor 0.

Paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fistulas) se planifico la aplicación sólo en el compartimento intraluminal valor 2. La aplicación intersticial se considero de riesgo por la proximidad de la vena cava superior (figura 32 y 33). Existía riesgo de daño de la misma, o de inyección directa de las células troncales en el torrente circulatorio, que no era el propósito.

Paso 6 (bloqueo de la fistula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) no se modificó, valor 1.

Algoritmo de planificación valor NN (no fue necesaria la adaptación de los pasos críticos); se acepta H1.

2. Obtención y aplicación de las células madre visita 1

Obtención de la fracción vasculo-estromal sin incidencias ni complicaciones operatorias de acuerdo a la técnica descrita. Desde la extracción de las células troncales a su implantación transcurrieron 4 horas.

Factibilidad

Factibilidad del paso 1 (obtención de las ASCs), valor 5 excelente. Se recogieron 150 ml de lipoaspirado. Tras el proceso de obtención de la fracción vasculo-estromal se contabilizaron para su aplicación 9,8 millones de células, cantidad suficiente para realizar el tratamiento. Las células mostraron una viabilidad del 98%.

Factibilidad del paso 2 (identificación de la fistula por broncoscopia), valor 5 excelente.

Factibilidad del paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fistulas), valor 4 fácil. No se considero excelente, porque una parte, no importante, un 20% del volumen de Tissucol Duo inyectado dentro de la cavidad mediastínica, antes de ganar consistencia, resbaló por gravedad a la luz traqueal extravasandose así del espacio fistuloso, perdiéndose de esta forma una fracción de las células troncales suspendidas en la fracción de trombina.

Factibilidad del paso 6 (bloqueo de la fistula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs), valor 4 fácil. No se considero excelente porque una fracción de Tissucol Duo, como se ha mencionado en el punto previo coaguló fuera de la fistula en la luz traqueal, de donde se aspiro. El resto quedo bloqueando la luz de la fistula.

Algoritmo de factibilidad valor 4-5; se acepta H1.

Complejidad

Tiempo quirúrgico de los pasos críticos.

Paso 1(lipoaspirado) tiempo: 35 minutos.

Paso 2 (identificación de la fistula por broncoscopia) tiempo: 5 minutos.

Paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fistulas) tiempo: 16 minutos.

Paso 6 (bloqueo de la fistula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) tiempo: el mismo.

Dificultades instrumentales

Broncoscopio rígido: valor 5.

Videobroncoscopio: valor 5.

Catéter de aplicación del Tissucol Duo, Duploduo valor valor 5.

Tiempo total 56 minutos

Dificultades anestésicas

De ventilación valor 0 (no hubo dificultades de ventilación).

De aspiración valor 0 (no hubo aspiraciones).

Algoritmo de complejidad: tiempos menores de 60 minutos, valores de 5 de los instrumentos, ausencia de dificultades anestésicas; por tanto se acepta H1.

Seguridad

Complicaciones intraoperatorias, valor: 0.

Complicaciones postoperatorias, valor: 0.

Efectos adversos, valor: 0

Algoritmo de seguridad: no hubo complicaciones ni efectos adversos se acepta H1.

3. Seguimiento

3.1 Control al mes:

Efectividad

Cierre de la fístula al mes, valor 2 (reducción en su tamaño superior al 50%); persiste el espacio pretraqueal pero endoscópicamente se ha producido una epitelización de la cavidad, con crecimiento de tejido conjuntivo desde el fondo. Las adenopatías aunque todavía identificables, son menos visibles. La entrada de la fístula se ha reducido pero todavía es posible pasar el endoscopio de 5 mm. Ha pasado de un tamaño de 12-14 mm a uno 6 mm.

Algoritmo de efectividad al ser un valor superior a cero no es necesario modificar los pasos críticos y se acepta la H1.

Seguridad

Complicaciones postoperatorias valor 0.

Efectos adversos valor 0.

3.2 Control a los 3 meses:

Efectividad

Cierre de la fístula al mes valor 3 (reducción en su tamaño superior al 75%); radiológicamente en el TAC los radiólogos aprecian una sustancial reducción del volumen del espacio pretraqueal superior al 75% aunque es reconocible todavía la solución de continuidad en la cara anterior de la tráquea. En la broncoscopia hay una notable mejoría, la reducción del tamaño de la fístula es superior al 75%, ya no es posible avanzar el endoscopio de 5 mm dentro de la cavidad mediastínica.

Algoritmo de efectividad al ser un valor 3 no es necesario modificar los pasos críticos y se acepta la H1.

Seguridad

Complicaciones postoperatorias a largo plazo valor 0.

Efectos adversos valor 0.

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

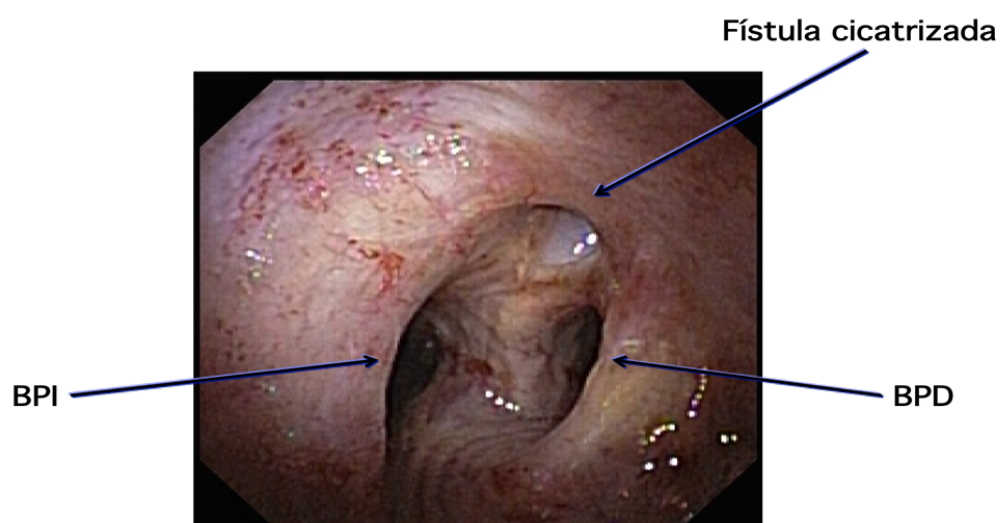
3.3 Control al año:

Efectividad

Cierre de la fístula a los 12 meses, valor 4-5 (reducción en su tamaño superior al 90%- cierre completo del 100%). El cierre del espacio pretraqueal es superior al 90%, se puede considerar completo del 100% salvo por un corte axial en el TAC donde persiste un vestigio de la fístula. A nivel endoscópico (figura 46) persiste una mínima solución de continuidad en la cara anterior de la carina traqueal, terminada en fondo de saco. Los bordes de la fístula y las paredes están completamente epitelizadas por un tejido nacarado con neovascularización muy duro a las biopsias (figura 47). Ya no es visible ninguno de los componentes mediastínicos, adenopatías o vasos. A nivel radiológico en el TAC la resolución es mas llamativa (figura 48).

Algoritmo de efectividad al ser un valor 4 no es necesario modificar los pasos críticos y se acepta la H1.

Figura 46.- Imagen endoscópica a los 12 meses del tratamiento



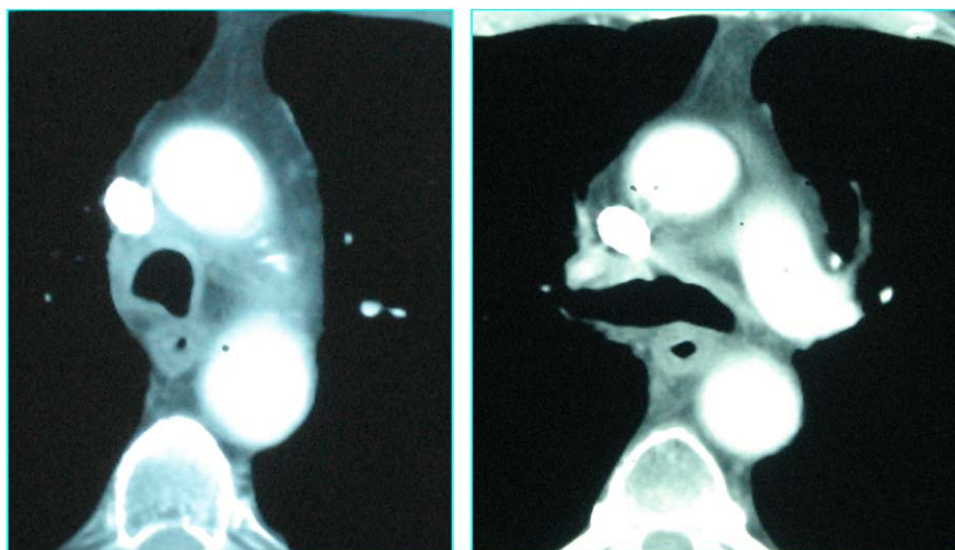
Visión de la carina traqueal con el nacimiento de los dos bronquios BPI (bronquio principal izquierdo) y BPD (bronquio principal derecho). En la cara anterior de la carina traqueal se visualiza una mínima fosita que marca la posición de la fistula con mediastinitis necrotizante, ahora claramente cicatrizada

Figura 47.- Imagen endoscópica próxima a la pared donde se aprecia el neoepitelio formado



Se puede apreciar el patrón de neovascularización

Figura 48.- Control de los TAC al año del procedimiento.



La cavidad mediastínica pretraqueal ha cicatrizado por completo, únicamente es visible una pequeña depresión en la cara anterior de la carina.

Seguridad

Efectos adversos a largo plazo valor 0.

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

Para lograr este resultado, no fue necesario más que un tratamiento.

C. Caso clínico número dos

1. Planificación

Paso 1 (obtención de las ASCs) no se modifico, valor 1.

Paso 2 (identificación de la fistula por broncoscopia) no se realizó valor 0, pues implicaba la retirada de la endoprótesis que bloqueaba la fistula por el lado traqueal.

Paso 3 (identificación de la fistula por esofagoscopia) no se modifico, valor 1.

Paso 4 (identificación de la fistula en la cavidad pleural) no procede, no se realizo, valor 0.

Paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fistulas) no se modifico, valor 1. Se planificó hacer la aplicación desde el lado esofágico, tanto intersticial como intraluminal, valor 3. La aplicación desde el lado traqueal, se descarto de acuerdo con el protocolo, ya que eso habría implicado la retirada de la endoprotesis que portaba el paciente, una endoprotesis autoexpandible de poliéster-silicona (Polyfex™ distribuida por *Boston Cientific*), su retirada hubiera implicado riesgo de aspiración en la vía aérea del contenido digestivo, mientras se realizaba el procedimiento.

Paso 6 (Factibilidad de bloqueo de la fistula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) no se modificó, valor 1.

Algoritmo de planificación valor NN (no fue necesaria la adaptación de los pasos críticos); se acepta H1.

2. Obtención y aplicación de las células troncales

2.1 Obtención de las células troncales, visita 1

La obtención de la fracción vasculo-estromal se hizo con incidencias mínimas (complicaciones intraoperatorias valor 2), de acuerdo a la técnica descrita. Las células se remitieron para su expansión en cultivo celular durante dos meses.

Factibilidad

Factibilidad del paso 1 valor 5 excelente. Se recogieron 230 ml de lipoaspirado. Tras el proceso de obtención de la fracción vasculo-estromal se contabilizaron 15 millones de células, que fueron sometidas durante dos meses a expansión con cultivo celular por la empresa

Cellerix. Se lograron 40 millones de células para su aplicación. Tenían una viabilidad próxima al 100%. Otro paquete de ACSs de igual cuantía se criopreservo por si fuera necesaria una segunda aplicación, que nunca se llevo a cabo al salir el paciente del estudio

Complejidad

Tiempo quirúrgico de los pasos críticos

Paso 1(obtención de las ASCs) tiempo 40 minutos.

Seguridad

Complicaciones intraoperatorias valor 2 (crisis hipertensiva durante la anestesia para la lipoaspiración con TA 200 mmHg sistólica y 100 mmHg diástolica que se regula con analgesia, 2 gr de Metamizol intravenoso.

Complicaciones postoperatorias valor 0.

Efectos adversos valor 0.

2.2 Aplicación de las células madre visita 2 (dos meses después de la lipoaspiración)

Factibilidad

Factibilidad del paso 3 (identificación de la fistula por esofagoscopia) valor 5 excelente.

Factibilidad del paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fistulas) valor 5 excelente. Se hizo la aplicación combinada intersticial e intraluminal, valor 3. Se hizo una aplicación intersticial, puncionandose con la aguja de esclerosis eofágica, en dos puntos de la entrada de la fistula (figura 49), a las 12 horas y a las 18 horas, la punción se hizo desde el lado esofágico mediante la realización de una esofagoscopia rígida a cuyo través se paso el videobroncoscopio. El lado traqueal se mantuvo ocluido con una endoprotesis para disminuir el riesgo de aspiración. Treinta millones de las células se aplicaron en el compartimento intersticial suspendidos en suero salino.

Factibilidad del paso 6 (Factibilidad de bloqueo de la fistula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) valor 4 fácil. Se utilizaron diez millones de células vehiculadas en la fracción de trombina de Tissucol Duo para bloquear con la malla de fibrina la luz de la fistula. Una parte se derramo en la traquea de donde tuvo que aspirarse.

Algoritmo de factibilidad valor 4-5; se acepta H1.

Figura .- Inyección intersticial con agujas de esclerosis esofágica



Complejidad

Tiempo quirúrgico de los pasos críticos

Paso 1 (obtención de las ASCs) tiempo 40 minutos.

Paso 3 (identificación de la fistula por esofagoscopia) tiempo 6 minutos.

Paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fistulas) tiempo 35 minutos.

Paso 6 (Factibilidad de bloqueo de la fistula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) 20 minutos.

Tiempo total 101 minutos

Dificultades instrumentales

Broncoscopio rígido valor 5

Videobroncoscopio valor 5

Esofagoscopio rígido valor 5

Agujas de esclerosis de varices esofágicas valor 5

Catéter Duploduo valor valor 5

Dificultades anestésicas

De ventilación valor 0 (no hubo dificultades de ventilación)

De aspiración valor 0 (no hubo aspiraciones)

Algoritmo de complejidad: tiempos menores de 60 minutos, valores de 5 de los instrumentos, ausencia de dificultades anestésicas; por tanto se acepta H1.

Seguridad

Complicaciones intraoperatorias valor 0

Complicaciones postoperatorias valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad: no hubo complicaciones ni efectos adversos se acepta H1.

3. Seguimiento

3.1 Control al mes:

Efectividad

Cierre de la fístula al mes valor 0, persiste, sin modificaciones, la fístula, que no muestra ninguna modificación en su morfología, fallo de curación (figura 50).

Figura 50.- Imagen esofágica al mes



La fístula no muestra ningún cambio

Algoritmo de efectividad, al ser un valor de cero se hizo un análisis comparativo con el caso 1.

Análisis comparativo: en el primer caso, el resultado de aplicar la técnica había sido muy favorable, alcanzándose un cierre del 100%, mientras que en este segundo caso se dio un fallo de cicatrización, valor 0, los resultados son casi opuestos, nos preguntamos ¿Qué diferencias se daban en las características iniciales de las fístulas, que pudieran explicar ese devenir tan diferente, ya que la técnica aplicada fue la misma? La principal diferencia que se apreció entre el primer caso y el segundo, que puede explicar esta diferencia de resultados, es que los bordes de la fístula y sus paredes eran cruentos en el primer caso, mientras que en el segundo caso, todo el trayecto estaba epitelizado. Este epitelio que cubría toda la fístula, actuaba como una barrera para la acción de las células mesenquimales, mientras persistiera este límite las células troncales no pueden promover el crecimiento celular y el anclaje de la matriz extracelular entre los bordes de la fístula. Como consecuencia de este análisis, se introdujo un paso nuevo en el diseño de la técnica endoscópica, que consistía en realizar antes de la aplicación de las células troncales una ablación de la mucosa de todo el trayecto fistuloso. Para lograrlo se escogió la coagulación por

argón-plasma que tiene una acción muy superficial. De esta forma se puede conseguir la ablación de la mucosa sin producir un daño térmico de la pared de la fístula.

De acuerdo con el algoritmo de efectividad y de perfeccionamiento de la técnica se acepta H1 y se introduce el nuevo paso quirúrgico, paso 7 nuevo.

Seguridad

Complicaciones postoperatorias valor 0

Efectos adversos valor 0

Criterios de retirada del estudio:

1. Petición del paciente

3.2 Control a los 3 meses:

Efectividad

No procede, retirado del estudio.

Seguridad

Complicaciones postoperatorias a largo plazo valor 0.

Efectos adversos valor 0.

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

3,3 Control al año:

Efectividad

No procede, retirado del estudio

Seguridad

Efectos adversos a largo plazo valor 0.

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

D. Caso clínico número tres

1. Planificación

Paso 1 (obtención de las ASCs) no se modifico, valor 1.

Paso 2 (identificación de la fistula por broncoscopia), no se modifico, valor 1

Paso 3 (identificación de la fistula por esofagoscopia), no procede, no se realizo, valor 0.

Paso 4 (identificación de la fistula en la cavidad pleural), no se modifico, valor 1.

Paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fistulas) no se modifico, valor 1. Se planifico hacer la aplicación intersticial e intraluminal desde los dos lados bronquial y pleura, valor 3.

Paso 6 (bloqueo de la fistula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) se modifico, valor 2. Como consecuencia de aplicar el algoritmo de planificación se vio que el bloqueo con la malla de fibrina se mejoraría, si se reducía la luz de la fistula aplicando tres puntos de Vicryl de 000 con aguja de medio cuarto, aprovechando el acceso desde la toracostomía abierta, mediante la asistencia con una óptica recta de 30° y un porta endoscópico.

Paso 7 nuevo (ablación de la mucosa del trayecto fistuloso), se mantuvo y se añadió un paso nuevo, arrovechando la posibilidad de abordaje del lado pleura por la toracostomia abierta.

Paso 8 nuevo: consistente en la ablación del epitelio pleura desde la cavidad de neumonectomía a donde se accedía por la toracostomía abierta. Se planifico una ablación mecánica mediante un legrado con curetas estándar.

Algoritmo de planificación valor PCA (pasos críticos adaptados) y PN (pasos nuevos). El paso critico 6 de bloqueo se modifico mejorándolo con tres puntos de aproximación. El paso 7 nuevo introducido en el caso 2 por fallo de efectividad consistente en a la ablación de la mucosa con electrocoagulación de argón plasma desde el lado bronquial se mantuvo. Además se introduce un paso nuevo el 8ª basado en la misma idea de eliminar las barreras que suponen las mucosas y los epitelios. Este paso 8 nuevo consiste en la ablación mecánica con curetas de legrado del epitelio pleural aprovechando el acceso desde la toracostomía abierta; se acepta H1 al ser posible la planificación incluyendo la modificación de los pasos críticos, y la introducción de pasos nuevos.

2. Obtención y aplicación de las células madre visita 1

La obtención de la fracción vasculo-estromal se hizo sin incidencias ni complicaciones operatorias de acuerdo a la técnica descrita.

Factibilidad

Factibilidad del paso 1 (obtención de las ASCs). valor 5 excelente. Se recogieron 220 ml de lipoaspirado. Tras el proceso de obtención de la fracción vasculo-estromal se contabilizaron para su aplicación 19,7 millones de células,. Tenían una viabilidad del 80%. Dos tercios se suspendieron en suero para aplicación intersticial desde ambos lados bronquial y pleura, el tercio restante se suspendió en la fracción de trombina del Tissucol Duo, que se aplico con Duploduo desde el lado pleura

Factibilidad del paso 2 (identificación de la fistula por broncoscopia), valor 5 excelente.

Factibilidad del paso 4 (identificación de la fistula en la cavidad pleural), valor 5 excelente.

Factibilidad del paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fistulas), valor 4 fácil. No se dio excelente porque la inyección intersticial desde el lado pleura debido a la fibrosis crónica ofreció algo de resistencia. Se hizo la aplicación combinada intersticial e intraluminal valor 3 desde los dos lados bronquial y pleural.

Factibilidad del paso 6 modificado (bloqueo de la fistula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) valor 4 fácil. Los puntos de Vicryl de 000 se dieron de forma sencilla utilizando la óptica de 30° grados y un porta endoscópico. Al completar con la inyección de Tissucol enriquecido con un tercio de las células troncales el resultado fue muy estable en el bloqueo. No se considero excelente porque nuevamente parte del adhesivo de fibrina quedo por fuera del conducto de la fistula. En este el sobrante no hubo que retirarlo (figura 51).

Factibilidad del paso 7 nuevo (la ablación de la mucosa bronquial) (figura 52), valor 5 excelente.

Factibilidad del paso 8 nuevo (la ablación del epitelio pleural) valor 5 excelente.

Algoritmo de factibilidad valor 4-5; se acepta H1

Figura 51.- Aspecto microscópico del bloqueo con al adhesivo de fibrina

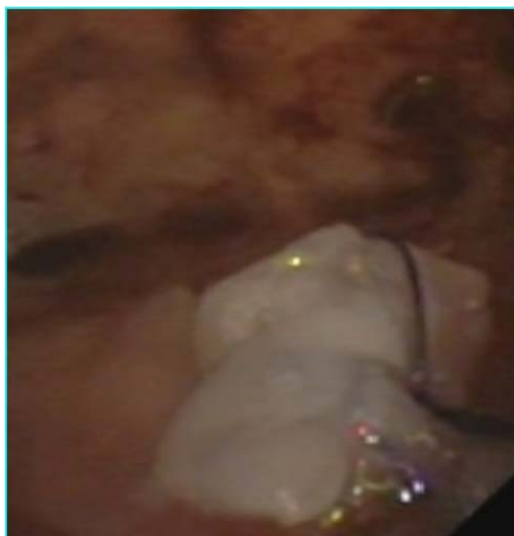


Figura 52.- Ablación de la mucosa bronquial con electrocoagulación de argón-plasma



Complejidad

Tiempo quirúrgico de los pasos críticos

Paso 1 (obtención de las ASCs) tiempo 20 minutos.

Paso 2 (identificación de la fístula por broncoscopia) tiempo 5 minutos.

Paso 4 (identificación de la fístula en la cavidad pleural) tiempo 5 minutos.

Paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fístulas) tiempo 45 minutos.

Paso 6 modificado (bloqueo de la fístula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) 35 minutos.

Paso 7 nuevo (ablación de la mucosa bronquial con electrocoagulación con argón-plasma) 10 minutos.

Paso 8 nuevo (ablación del epitelio pleural con curetas) 12 minutos

Tiempo total 132 minutos

Dificultades instrumentales

Broncoscopio rígido valor 5 excelente.

Videobroncoscopio valor 5 excelente.

Dispositivo de electrocoagulación de argon-plasma valor 4 fácil.

Curetas de legrado para realizar la ablación mecánica del epitelio pleural, valor 5 excelente.

Toracoscopia con óptica de 30° grados valor 5 excelente.

Porta endoscópico y puntos de sutura trenzada reabsorbible de 3/0 de poliglactin 910 (Vicryl®) de 000 valor 4 fácil.

Agujas de esclerosis de varices esofágicas para la aplicación intersticial valor 5 excelente.

Catéter Duploduo valor 5 excelente.

Dificultades anestésicas

De ventilación valor 0 (no hubo dificultades de ventilación)

De aspiración valor 0 (no hubo aspiraciones)

Algoritmo de complejidad: tiempos menores de 60 minutos, valores de 4-5 de los instrumentos, ausencia de dificultades anestésicas; por tanto se acepta H1.

Seguridad

Complicaciones intraoperatorias valor 0

Complicaciones postoperatorias valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad: no hubo complicaciones ni efectos adversos se acepta H1.

3. Seguimiento

3.1 Control al mes

Efectividad

Cierre de la fístula al mes valor 1 persiste el trayecto fastuoso pero se ha reducido en mas de un 50% ahora tiene un diámetro de 2 mm. El estudio iconográfico con el TAC confirma estos hallazgos.

Algoritmo de efectividad al ser un valor superior a cero no es necesario modificar los pasos críticos y se acepta la H1.

Seguridad

Complicaciones intraoperatorias valor 0

Complicaciones postoperatorias valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

3.2 Control a los 3 meses:

Efectividad

El cierre se ha incrementado ahora el trayecto es de 1 mm en la exploración endoscópica con dos bocas en el lado bronquial y una en el lado pleura. Los estudios iconograficos con el TAC debido a la disminución de la fístula ya no son capaces de ofrecer una estimación exacta del tamaño.

Seguridad

Complicaciones postoperatorias a largo plazo valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

3.3 Control al año :

Efectividad

El cierre se ha estabilizado y no ha progresado la curación mantiene los mismos valores que en la revisión a los 3 meses (figura 53).

Figura 53.- Visión pleuroscópica de la fístula residual



Algoritmo de efectividad al ser un valor superior a cero no es necesario modificar los pasos críticos y se acepta la H1.

Dado que se ha producido una respuesta efectiva al tratamiento con célula troncales mesenquimales valor 3 de un 75%, pero no completo persistiendo un trayecto fistulas marginal, de tamaño muy pequeño de 1 mm; se indica un segundo tratamiento con células troncales mesenquimales

Seguridad

Complicaciones postoperatorias a largo plazo valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

2. Visita 0, segundo tratamiento

Planificación de la segunda aplicación de células ASCs

Paso 1 no se modifico valor 1

Paso 2 no se modifico valor 1

Paso 3 no procede, no se realizo valor 0

Paso 4 no se modifico valor 1

Paso 5 no se modifico valor 1. Se planifico repetir exactamente los mismos pasos que en la primera aplicación.

Paso 6 se modifico. Se reprodujo el mismo paso dado en la primera aplicación modificado con la utilización de puntos

Paso 7 nuevo (ablación de la mucosa del trayecto fistuloso), se mantuvo como en el primer tratamiento.

Paso 8 nuevo (ablación del epitelio pleural con curetas), se mantuvo como en el primer tratamiento.

Algoritmo de planificación se repitió punto por punto los pasos de la primera aplicación; se acepta H1

2. Aplicación de las células madre visita 2

La obtención de la fracción vasculo-estromal se hizo sin incidencias ni complicaciones operatorias de acuerdo a la técnica descrita.

Factibilidad

Factibilidad del paso 1 valor 5 excelente. Se recogieron 160 ml de lipoaspirado. Tras el proceso de obtención de la fracción vasculo-estromal se contabilizaron para su aplicación 5,22 millones de células. Tenían una viabilidad del 92%. Dos tercios se suspendieron en suero

para aplicación intersticial desde ambos lados bronquial y pleura, el otro tercio se suspendió en la fracción de trombina del Tissucol Duo, que se aplicó con Duploduo desde el lado pleura

Factibilidad del paso 2 valor 5 excelente.

Factibilidad del paso 4 valor 5 excelente.

Factibilidad del paso 5 valor 4 fácil Se hizo la aplicación combinada intersticial e intraluminal valor 3 desde los dos lados bronquial y pleural. Nuevamente a la inyección intersticial desde el lado pleural se encontró resistencia por la fibrosis.

Factibilidad del paso 6 modificado valor 4 fácil. Los puntos de Vicryl de 000 se dieron de forma sencilla utilizando la óptica de 0 grados y un porta estándar. Al completar con la inyección de Tissucol enriquecido con el 50% de las células troncales el resultado fue igual de satisfactorio que la primera aplicación.

Factibilidad del paso de la ablación de la mucosa y del epitelio pleura valor 5 excelente.

Algoritmo de factibilidad valor 4-5; se acepta H1

Complejidad

Tiempo quirúrgico de los pasos críticos

Paso 1 tiempo 30 minutos

Paso 2 tiempo 5 minutos

Paso 4 tiempo 5 minutos

Paso 5 tiempo 35 minutos

Paso 6 25 minutos

Paso 7 8 minutos

Paso 8 10 minutos

Tiempo total 118 minutos

Dificultades instrumentales

Broncoscopio rígido valor 5

Videobroncoscopio valor 5

Dispositivo de electrocoagulación de argon-plasma valor 4 fácil.

Curetas de legrado para realizar la ablación mecánica del epitelio pleural, valor 5 excelente.

Toracoscopia con óptica de 30° grados valor 5 excelente.

Porta endoscópico y puntos de Vicryl de 000 valor 4 fácil.

Agujas de esclerosis de varices esofágicas para la aplicación intersticial valor 5

Duplodo valor 5

Dificultades anestésicas

De ventilación valor 0 (no hubo dificultades de ventilación)

De aspiración valor 0 (no hubo aspiraciones)

Algoritmo de complejidad: tiempos menores de 60 minutos, valores de 5 de los instrumentos, ausencia de dificultades anestésicas; por tanto se acepta H1.

Seguridad

Complicaciones intraoperatorias valor 0

Complicaciones postoperatorias valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad: no hubo complicaciones ni efectos adversos se acepta H1.

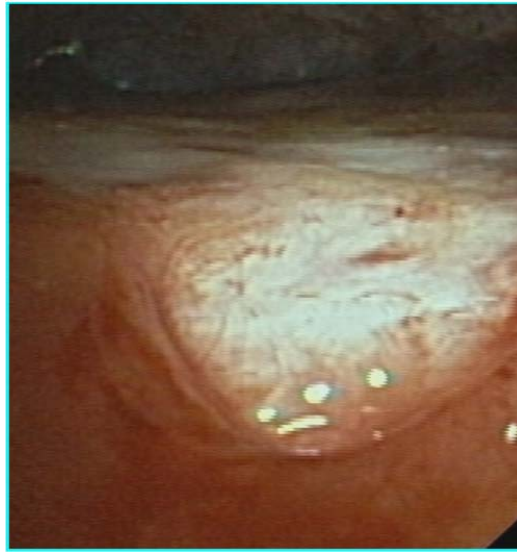
3. Seguimiento

3.1 Control al mes

Efectividad

Cierre completo de la fístula al mes valor 5 no es posible identificar el punto donde se situaba la fístula (figura 54). El estudio iconográfico con el TAC confirma estos hallazgos.

Figura 54.- Visión pleural con ausencia de fístula



Algoritmo de efectividad al ser un valor 5 no es necesario modificar los

Algoritmo de efectividad al ser un valor 5 no es necesario modificar los pasos críticos y se acepta la H1.

Seguridad

Complicaciones intraoperatorias valor 0

Complicaciones postoperatorias valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

3.2 Control a los 3 meses:

Efectividad

Se mantuvo el cierre completo

Seguridad

Complicaciones postoperatorias a largo plazo valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

3.3 Control al año :

Efectividad

Se mantuvo el cierre completo valor 5

Seguridad

Complicaciones postoperatorias a largo plazo valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

E. Caso clínico número cuatro

1. Planificación

Paso 1 (obtención de las ASCs) no se modifico valor 1.

Paso 2 (identificación de la fístula por broncoscopia) no se modifico valor 1.

Paso 3 (identificación de la fístula por esofagoscopia) no procede, no se realizo valor 0.

Paso 4 (identificación de la fístula en la cavidad pleural) no procede, , no se realizo valor 0.

Paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fístulas) no se modifico valor 1. Se planifico hacer la aplicación intersticial solo desde el lado bronquial, por la mala identificación en el lado pleural.

Paso 6 (bloqueo de la fístula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) no se modifico. Ante la ausencia de toracostomia abierta se considero que la aplicación de los tres puntos de Poliglactin de 000 no era factible y no se planificó.

Paso 7 nuevo: El paso de ablación de la mucosa introducido en el segundo caso se mantuvo, como no se podía acceder al lado pleura solo se hizo la ablación de la mucosa bronquial con la electrocoagulación de argón-plasma.

Paso 8 nuevo: no procede, valor 0.

Algoritmo de planificación de los pasos crítico, valor NN (no necesario). El paso crítico 6 de bloqueo no se modifico, no se usaron los tres puntos de aproximación, al no ser posible el acceso pleura. El pasos 7 nuevo introducido en el caso 2 por fallo de efectividad se mantuvo. El paso 8 nuevo introducido en el caso 3 no se realizó por imposibilidad en este paciente de abordar el lado pleural; se acepta H1

2. Aplicación de las células madre visita 1

La obtención de la fracción vasculo-estromal se hizo sin incidencias ni complicaciones operatorias de acuerdo a la técnica descrita.

Factibilidad

Factibilidad del paso 1 (obtención de las ASCs) valor 5 excelente. Se recogieron 350 ml de lipoaspirado. Tras el proceso de obtención de la fracción vasculo-estromal se contabilizaron para su aplicación 13,2 millones de células. Tenían una viabilidad del 95%. La mitad se suspendieron en suero para aplicación intersticial solo desde el lado bronquial, el otro 50% se suspendió en la fracción de trombina del Tissucol Duo, que se aplicó con Duploduo desde el lado bronquial.

Factibilidad del paso 2 (identificación de la fístula por broncoscopia) valor 5 excelente.

Factibilidad del paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fístulas) valor 5 excelente. Se hizo la aplicación combinada intersticial e intraluminal valor 2 solo desde el lado bronquial.

Factibilidad del paso 6 (bloqueo de la fístula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) no modificado valor 4 fácil. En este caso, como en otros de la serie no se dio el valor de excelente porque parte del Tissucol Duo quedó fuera del trayecto fistuloso en la luz del bronquio intermediario. Hubo que retirar el sobrante intraluminal que impedía el paso al bronquio del lobar medio.

Factibilidad del paso 7 nuevo (ablación de la mucosa del trayecto fistuloso) valor 5 excelente.

Algoritmo de factibilidad valor 4-5; se acepta H1

Complejidad

Tiempo quirúrgico de los pasos críticos

Paso 1 (obtención de las ASCs) tiempo 35 minutos

Paso 2 (identificación de la fístula por broncoscopia) tiempo 5 minutos

Paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fístulas) tiempo 25 minutos

Paso 6 (bloqueo de la fístula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) 15 minutos

Tiempo total 90 minutos

Dificultades instrumentales

Broncoscopio rígido valor 5

Videobroncoscopio valor 5

Dispositivo de electrocoagulación de argon-plasma valor 4.

Agujas de esclerosis de varices esofágicas para la aplicación intersticial valor 5

Duploduo valor valor 5

Dificultades anestésicas

De ventilación valor 0 (no hubo dificultades de ventilación)

De aspiración valor 0 (no hubo aspiraciones)

Algoritmo de complejidad: tiempos menores de 60 minutos, valores de 5 de los instrumentos, ausencia de dificultades anestésicas; por tanto se acepta H1.

Seguridad

Complicaciones intraoperatorias valor 0

Complicaciones postoperatorias valor 1 Se produjo una infección de uno de los puntos dados donde se realizó la liposucción

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad: hubo complicaciones de grado 1, no efectos adversos se acepta H1.

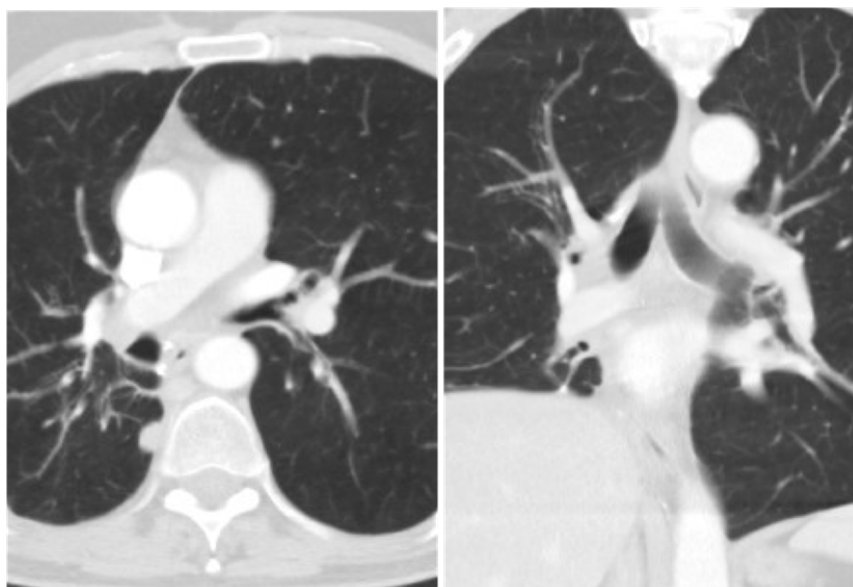
3. Seguimiento

3.1 Control al mes

Efectividad

Cierre completo endoscopio de la fístula y desaparición en el TAC de las cámaras de hidro-neumotórax, valor 5 (figura 55).

Figura 55.- Resolución en el TAC de la fístula y la cámara pleural



Algoritmo de efectividad al ser un valor 5 no es necesario modificar los pasos críticos ni los nuevos y se acepta la H1.

Seguridad

Complicaciones intraoperatorias valor 0

Complicaciones postoperatorias valor 1. Se produjo una infección de uno de los puntos dados donde se realizó la liposucción, que se resolvió en una semana.

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad al ser un valor 2 se acepta la H1.

3.2 Control a los 3 meses:

Efectividad

Se mantuvo el cierre completo valor 5

Seguridad

Complicaciones postoperatorias a largo plazo valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

3.3 Control al año :

Efectividad

Se mantuvo el cierre completo, valor 5

Seguridad

Complicaciones postoperatorias a largo plazo valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

F. Caso clínico número cinco

1. Planificación

Paso 1 (obtención de las ASCs) no se modifico, valor 1.

Paso 2 (identificación de la fistula por broncoscopia) no se modifico, valor 1.

Paso 3 (identificación de la fistula por esofagoscopia) no es posible, la exclusión esofágica lo impide, valor 0.

Paso 4 (identificación de la fistula en la cavidad pleural) no se modifico, desde la cavidad pleura se accede simultáneamente al esófago y a la cavidad pleura, que forman un compartimento único, valor 0.

Paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fistulas) no se modifico, valor 1. Se planificó hacer la aplicación desde ambos lados bronquial y pleural, valor 3.

Paso 6 (bloqueo de la fistula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) se modifico, valor 2. Al igual que en el tercer caso se vio que el bloqueo con la malla de fibrina se mejoraría, si se reducía la luz de la fistula aplicando tres puntos de Vicryl 000 con aguja de medio cuarto, para su ejecución se aprovecho el acceso desde la toracostomía abierta, mediante la asistencia con una óptica recta de 30° y un porta endoscópico.

Paso 7 nuevo (ablación de la mucosa del trayecto fistuloso), no se modifico, se realizo la ablación con electrocogulación de argon-plasma aplicandose desde le lado bronquial.

Paso 8 nuevo (ablación del epitelio esofágico que tapiza el orificio fistuoso pleuroesofágico) Se utilizaron curetas de 5X3 mm de cucharilla. Se empleo también el acceso por el toracostoma.

Algoritmo de planificación valor PCA (pasos críticos adaptados), el paso crítico 6 de bloqueo se modificó mejorándolo con tres puntos de aproximación.

No se introdujeron pasos nuevos (PN), se mantuvieron los pasos 7 y 8 introducidos en el caso 2. El paso 7 consistente en la ablación de la mucosa con electrocoagulación de argón plasma desde el lado bronquial se mantuvo. También se mantuvo sin modificaciones el paso 8 consiste en la ablación mecánica con curetas de legrado del epitelio esofágico aprovechando el acceso desde la toracostomía abierta).

Se acepta H1 al ser posible la planificación incluyendo la modificación de los pasos críticos, y el mantenimiento de los pasos nuevos.

2. Obtención y aplicación de las células troncales

2.1 Obtención de las células troncales, visita 1

La obtención de la fracción vasculo-estromal. Las células se remitieron para su expansión en cultivo celular, a las 3 semanas ya se tenía un volumen de 20 millones de células que permitieron planificar la implantación.

Factibilidad

Factibilidad del paso 1 valor 5 excelente. Se recogieron 180 ml de lipoaspirado de los muslos. Tras el proceso de obtención de la fracción vasculo-estromal se contabilizaron 10 millones de células, La muestra fue recogida y etiquetada por el biólogo de la unidad de terapia celular del Hospital Universitario La Paz, y trasladada al laboratorio productor para su procesamiento, cultivo y expansión. En este caso el laboratorio encargado de llevar a cabo su cultivo y expansión fue el laboratorio de producción celular del Hospital Ramón y Cajal. Se lograron 40 millones de células en pocas semanas, de estas 20 millones se apartaron para su aplicación y el resto se criopreservaron por si fuera necesario un segundo tratamiento ulterior. Tenían una viabilidad del 98%.

Complejidad

Tiempo quirúrgico de los pasos críticos

Paso 1 (obtención de las ASCs) tiempo 30 minutos.

Seguridad

Complicaciones intraoperatorias valor 0.

Complicaciones postoperatorias valor 0.

Efectos adversos valor 0.

2.2 Aplicación de las células madre visita 2 (dieciocho días después de la lipoaspiración)

Factibilidad

Factibilidad del paso 2 (identificación de la fístula por broncoscopia) valor 5 excelente.

Factibilidad del paso 4 (identificación de la fístula en la cavidad pleural) valor 4 fácil. No fue considerado excedente porque la anatomía distorsionada de la toracostomía abierta cambio las referencias anatómicas, haciendo más laboriosa la identificación.

Factibilidad del paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fístulas) valor 4 fácil. Se hizo la aplicación combinada intersticial e intraluminal, valor 3. Se hizo una aplicación intersticial, puncionandose con la aguja de esclerosis esofágica, en dos puntos de la entrada de la fístula, a las 12 horas y a las 18 horas de la fístula por su lado bronquial. En el lado esofágico se realizó la inyección accediendo desde el toracostoma, su localización requirió más tiempo del esperado por eso se dio el valor 4 fácil en lugar del excelente.

Factibilidad del paso 6 modificado (Factibilidad de bloqueo de la fístula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) valor 4 fácil. Además de los tres puntos de Vicryl 000, se utilizaron cinco millones de células vehiculadas en la fracción de trombina de Tissucol Duo para bloquear con la malla de fibrina la luz de la fístula. Nuevamente una parte se derramo en la luz bronquial de donde tuvo que aspirarse.

Factibilidad del paso 7 nuevo (ablación de la mucosa) valor 5 excelente.

Factibilidad del paso 8 nuevo (ablación del epitelio esofágico que tapiza el orificio fistuloso pleuroesofágico) valor fácil. Nuevamente la distorsión anatomica dificulta el curetaje.

Algoritmo de factibilidad valor 4-5; se acepta H1.

Complejidad

Tiempo quirúrgico de los pasos críticos

Paso 1 (obtención de las ASCs) tiempo 30 minutos.

Paso 2 (identificación de la fístula por broncoscopia) tiempo 5 minutos.

Paso 4 (identificación de la fístula en la cavidad pleural) tiempo 12 minutos.

Paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fístulas) tiempo 45 minutos.

Paso 6 (Factibilidad de bloqueo de la fístula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) 40 minutos.

Paso 7 nuevo (ablación de la mucosa) tiempo 5 minutos

Paso 8 nuevo (ablación del epitelio esofágico que tapiza el orificio fistuloso pleuroesofágico) tiempo 15 minutos.

Tiempo total 147

Dificultades instrumentales

Broncoscopio rígido valor 5

Videobroncoscopio valor 5

Dispositivo de electrocoagulación de argon-plasma valor 4 fácil.

5 Curetas de legrado para realizar la ablación mecánica del epitelio esofágico, valor excelente.

Toracoscopia con óptica de 30° grados valor 5 excelente.

Porta endoscópico y puntos de Vicryl de 000 valor 4 fácil.

excelente. Aguas de esclerosis de varices esofágicas para la aplicación intersticial valor 5

Catéter Duploduo valor valor 5 excelente.

Dificultades anestésicas

De ventilación valor 0 (no hubo dificultades de ventilación)

De aspiración valor 0 (no hubo aspiraciones)

Algoritmo de complejidad: tiempos menores de 60 minutos, valores de 4-5 de los instrumentos, ausencia de dificultades anestésicas; por tanto se acepta H1.

Seguridad

Complicaciones intraoperatorias valor 0

Complicaciones postoperatorias valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad: no hubo complicaciones ni efectos adversos se acepta H1.

3. Seguimiento

3.1 Control al mes:

Efectividad

Cierre de la fístula al mes valor 3 (Reducción en su tamaño superior al 75%).

En la broncoscopia de control realizada se observa un cierre de un 80% (figura 56), pero se confirma que persiste el trayecto por la existencia de burbujeo ocasional a través de la zona tratada de la fístula. Se estima el tamaño de 1 mm de ancho por 2 mm de profundidad. Pero endoscópicamente ya no se aprecia el paso de secreciones esofágicas al árbol bronquial que ahora está limpio sin secreciones aumentadas.

Algoritmo de efectividad al ser un valor superior a cero no es necesario modificar los pasos críticos y se acepta la H1.

Figura 56.- Reducción de la fistula un 80%



Seguridad

Complicaciones postoperatorias valor 0

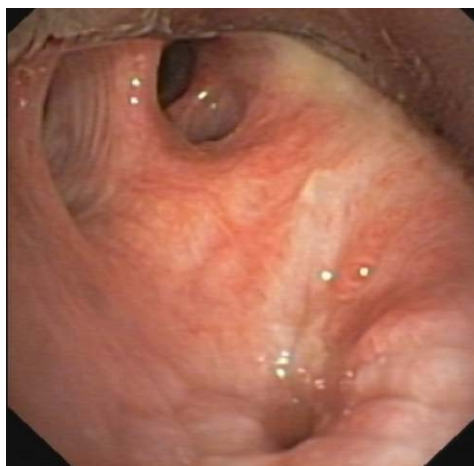
Efectos adversos valor 0

3.2 Control a los 3 meses:

Efectividad

Respecto a la exploración al mes la fistula ha recurrido, ahora de nuevo se produce paso de las secreciones esofágicas en la vía aérea, y es posible insinuar la punta del broncoscopio dentro de la luz de la fistula. Se estima un diámetro de 2 mm (figura 57).

Figura 57.- Broncoscopia de la recurrencia de la fistula



Algoritmo de efectividad al ser un valor 3 no es necesario modificar los pasos críticos y se acepta la H1.

Pero al producirse una regresión en el tamaño de la fistula tras una respuesta inicial muy buena, valor 3, se indica la realización de un segundo tratamiento células troncales mesenquimales

Seguridad

Complicaciones postoperatorias a largo plazo valor 0.

Efectos adversos valor 0.

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

2. Visita 0, segundo tratamiento

Planificación de la segunda aplicación de células ASCs

Paso 1 (obtención de las ASCs) no fue necesario. En este caso en el laboratorio de producción celular donde se había mandado el primer lipoaspirado tenían reservas de

células mesenquimales (criopreservadas) para poder expandirlas de nuevo y poder realizar un segundo tratamiento.

Paso 2 (identificación de la fistula por broncoscopia) no se modifico valor 1

Paso 3 (identificación de la fistula por esofagoscopia) no es posible, la exclusión esofágica lo impide, valor 0.

Paso 4 (identificación de la fistula en la cavidad pleural) no se modifico valor 1

Paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fistulas) no se modifico, valor 1. Se planificó hacer la aplicación desde ambos lados bronquial y pleural, valor 3.. Se planifico repetir exactamente los mismos pasos que en la primera aplicación.

Paso 6 (bloqueo de la fistula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) se modifico, valor 2. Se hizo la misma modificación que en el primer tratamiento.

Paso 7 nuevo (ablación de la mucosa del trayecto fistuloso), no se modifico, se hizo igual que en el primer tratamiento

Paso 8 nuevo (ablación del epitelio esofágico que tapiza el orificio fistuoso pleuroesofágico) no se modifico, se hizo igual que en el primer tratamiento

Se acepta H1 al ser posible la planificación incluyendo la modificación de los pasos críticos, y el mantenimiento de los pasos nuevos.

2. Aplicación de las células madre visita 2

Factibilidad

Factibilidad del paso 1(obtención de las ASCs), valor 5 excelente. Con las célula troncales mesenquimales (criopreservadas) que quedaban en el laboratorio de producción celular del Hospital Ramón y Cajal fue posible obtener de nuevo Las ASCs. En este segundo tratamiento, ante la respuesta parcial de la fistula pero no el logro del cierre total, tal como se contemplaba en el protocolo de tratamiento, se procedió a doblar la dosis, en lugar de los 20 millones administrados en el primer tratamiento se administraron 40 millones. A las cuatro semanas se disponía de esa cantidad de células con una viabilidad del 100%.

Factibilidad del paso 2 (identificación de la fistula por broncoscopia), valor 5 excelente.

Factibilidad del paso 4 (identificación de la fístula en la cavidad pleural), valor 4 fácil. Al igual que en el primer tratamiento la distorsión anatómica producida por la toracostomía abierta dificultó la localización del trayecto fistuloso.

Factibilidad del paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fístulas), valor 4 fácil se repitieron los pasos del primer tratamiento encontrándose algunas dificultades para identificar los bordes de la fístula, donde infiltrar las ASCs, desde el lado pleura.

Factibilidad del paso 6 (bloqueo de la fístula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) modificado valor 4 fácil. Los puntos de Vicryl de 000 se dieron de forma sencilla utilizando la óptica de 0 grados y un porta estándar. La aplicación de Tissucol Duo se hizo sin incidencias.

Factibilidad del paso 7 nuevo (ablación de la mucosa) valor 5 excelente.

Factibilidad del paso 8 nuevo (ablación del epitelio esofágico que tapiza el orificio fistuloso pleuroesofágico) valor fácil. Al igual que en el primer tratamiento la distorsión anatómica dificultó el curetaje.

Algoritmo de factibilidad valor 4-5; se acepta H1

Complejidad

Tiempo quirúrgico de los pasos críticos

Paso 1 (obtención de las ASCs) no fue necesario.

Paso 2 (identificación de la fístula por broncoscopia) tiempo 5 minutos

Paso 4 (identificación de la fístula en la cavidad pleural) tiempo 15 minutos

Paso 5 (aplicación de las ASCs en al menos uno de los compartimentos de la fístulas) tiempo 50 minutos

Paso 6 (bloqueo de la fístula la matriz de fibrina enriquecida con ASCs) 20 minutos

Paso 7 nuevo (ablación de la mucosa) tiempo 5 minutos

Paso 8 nuevo (ablación del epitelio esofágico que tapiza el orificio fistuloso pleuroesofágico) tiempo 16 minutos.

Dificultades instrumentales

Broncoscopio rígido valor 5

Videobroncoscopio valor 5

Dispositivo de electrocoagulación de argon-plasma valor 4 fácil.

Curetas de legrado para realizar la ablación mecánica del epitelio pleural, valor 5 excelente.

Toracoscopia con óptica de 30° grados valor 5 excelente.

Porta endoscópico y puntos de Vicryl de 000 valor 4 fácil.

Agujas de esclerosis de varices esofágicas para la aplicación intersticial valor 5

Duploduo valor 5

Dificultades anestésicas

De ventilación valor 0 (no hubo dificultades de ventilación)

De aspiración valor 0 (no hubo aspiraciones)

Algoritmo de complejidad: tiempos menores de 60 minutos, valores de 5 de los instrumentos, ausencia de dificultades anestésicas; por tanto se acepta H1.

Seguridad

Complicaciones intraoperatorias valor 0

Complicaciones postoperatorias valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad: no hubo complicaciones ni efectos adversos se acepta H1.

3. Seguimiento

3.1 Control al mes

Efectividad

La fístula vuelve a tener el mismo tamaño que tras el segundo tratamiento, persiste reducción del trayecto fistuloso respecto a la situación nasal antes del inicio de tratamiento con células troncales mesenquimales, pero respecto al punto de partida del segundo tratamiento (2 mm) no se ha producido ningún progreso o mejoría, es interesante anotar que en las revisiones realizadas las primeras semanas se observó un cierre completo de la fístula, así que como ocurrió en el primer tratamiento se logra una mejoría inicial que no se establece y la fístula recurre. Por tanto se considera un fallo de respuesta parcial no completa y se saca a la paciente del estudio para poder aplicar otros tratamientos.

Algoritmo de efectividad al superior a 0 no es necesario modificar los pasos críticos y se acepta la H1.

Seguridad

Complicaciones intraoperatorias valor 0

Complicaciones postoperatorias valor 0

Efectos adversos valor 0

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

3.2 Control a los 3 meses:

Efectividad

No procede, retirado del estudio.

Seguridad

Complicaciones postoperatorias a largo plazo valor 0.

Efectos adversos valor 0.

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

3,3 Control al año:

Efectividad

No procede, retirado del estudio

Seguridad

Efectos adversos a largo plazo valor 0.

Algoritmo de seguridad al ser un valor 0 se acepta la H1.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

A. Discusión de la metodología

Establecer una metodología que de una forma precisa permitiera validar los procesos quirúrgicos nuevos fue uno de los objetivos secundarios que nos planteamos en esta tesis. El método que nos propusimos desarrollar tenía que ser capaz de recoger los cambios dinámicos que se dan en el diseño de un procedimiento quirúrgico novedoso hasta lograr su ajuste.

Para dar respuesta a este objetivo nos preguntamos que criterios debería cumplir una técnica quirúrgica nueva para ser aceptada, es decir, validada. Al contestar esta pregunta vimos que un proceso quirúrgico para ser aceptado tiene que cumplir los siguientes atributos: debe ser factible en su ejecución, tiene que ser fácil de realizar, no debe de ser complejo, lo que implica tiempos de ejecución e idoneidad de los instrumentos para llevar a termino las tareas, no tiene que entrañar dificultades anestésicas, tiene que ser seguro, libre de complicaciones (tanto intraoperatorias, postoperatorias tempranas o a largo plazo), carecer de efectos adversos y, por último, tiene que ser efectivo.

Cada uno de estos puntos se consideró una variable a estudio, la variable principal fue la factibilidad y el resto se consideraron secundarias. Para estimar cada variable se elaboraron escalas precisas de graduación divididas en cinco puntos. A cada punto se le dio una definición concreta que evitara las ambigüedades de su aplicación. Cuando fue posible se usaron escalas ya validadas, como la escala de complicaciones de Clavien-Dindo¹¹⁶. Para la valoración de los efectos adversos se utilizaron los criterios desarrollados en el curso de farmacología clínica aplicada de Sadaba¹¹⁹. Para valorar la efectividad y evitara al máximo el fuerte efecto placebo que tienen las intervenciones quirúrgicas se buscó estimar la efectividad con un parámetro objetivo, en nuestro caso de estudio el tamaño de la fístula por broncoscopia, complementado por las imágenes tomadas por TAC.

Para cuantificar de la forma más exacta posible la variable principal de factibilidad, la técnica quirúrgica endoscópica se descompuso en sus elementos esenciales. Esto llevó a identificar 6 escalones del procedimiento bien definidos. La escala de factibilidad se aplicó por separado a cada uno de ellos. Esto permitió evaluar de forma independiente la bondad de cada paso, si uno sólo de los pasos puntuaba dos o menos llevaba a descartar la totalidad de la técnica y aceptar la hipótesis nula. Esto es lógico ya que si uno sólo de los pasos no es factible, tampoco lo es la

técnica en su totalidad. No obstante, cuando alguno de los 6 pasos críticos puntuó 3 se permitió su modificación, que era probada en el siguiente caso. A su vez esta división de la técnica en 6 escalones permitió la adaptación de cada uno de los pasos a las características de la fístula de cada paciente y su tratamiento celular asociado al quirúrgico.

Esta flexibilidad para la adaptación de cada etapa del proceso quirúrgico fue esencial para lograr un ajuste adecuado a la amplia variabilidad que poseen las fístulas en su presentación clínica, variando lugar, tipo, tamaño, etc. Proponer una técnica única para todas ellas no habría sido posible. Por tanto se introdujo un algoritmo de planificación que se dirigía específicamente a concretar de forma precisa como podía hacerse la adaptación de cada uno de los pasos a los diferentes casos. Las opciones de adaptación posibles se limitaban a cuatro, que son: la adaptación no es necesaria (NN), el paso crítico se adapta (PCA), la adaptación es de tal grado que implica introducir un paso nuevo (PN) o la adaptación no es posible (NP). En los tres primeros supuestos, al ser posible la adaptación de la técnica aunque esa adaptación sea tan profunda que implique introducir un paso nuevo, se permitía aceptar la hipótesis principal. Solo en el cuarto caso la imposibilidad de adaptación de la técnica, ni con la introducción de pasos nuevos, llevaría a aceptar la hipótesis nula. Los pasos nuevos introducidos como consecuencia del proceso de adaptación de la técnica son sometidos al mismo proceso de validación que los pasos críticos, es decir, tienen que ser factibles, sencillos de ejecutar, seguros y efectivos.

El proceso de ajuste de la técnica quirúrgica no sólo se lleva a cabo en la planificación sino que hay dos circunstancias que pueden llevar a modificar los pasos o a la necesidad de introducir nuevos escalones, que son fallos de grado 3 en la ejecución (factibilidad) y los fallos de efectividad grado 0 (fallo de curación 0 completo con ausencia de respuesta). Para concretar como se realiza esos ajustes se elaboró el algoritmo de perfeccionamiento de la técnica endoscópica. Con la elaboración de los algoritmos de planificación y de perfeccionamiento se quiso plasmar en un diagrama de flujo la forma habitual de trabajar los cirujanos en su práctica diaria, cuando aplican las técnicas quirúrgicas a un paciente con una patología concreta. En primer lugar hacen una planificación para adaptar la técnica al paciente, es decir, se personaliza la técnica, y luego, después de aplicarla, si se han producido fallos de factibilidad o de efectividad hacen las modificaciones pertinentes.

Los algoritmos tuvieron, además de permitir ajustar y perfeccionar la técnica, la función de permitir validar o rechazar la hipótesis principal. Para eso, al diseñar los algoritmos de

planificación, factibilidad, complejidad, seguridad, efectividad y perfeccionamiento, se definió *a priori* que resultados llevarían a aceptar la hipótesis principal o la hipótesis nula. La hipótesis principal se aceptaba cuando se dieran los siguientes resultados: la adaptación de la técnica fuera posible; la factibilidad obtuviera valores 4-5 (su realización fuera fácil o excelente), la ejecución de cualquier paso no superase los 60 min (se consideró que si algún paso superaba en su ejecución más de una hora significaba claramente que la técnica no era práctica), los instrumentos fueran idóneos con una puntuación de 4-5 (fáciles de usar o perfectamente adaptados a su propósito), la anestesia no tuviera problemas de ventilación por pérdidas de aire insuflado por la fistula ni se dieran problemas anestésicos de aspiración, las complicaciones intraoperatorias no existieran o fueran leves o menos graves; las complicaciones postoperatorias no alcanzaran el grado III y los efectos adversos de existir fueran leves. En realidad el tiempo que se tarda en realizar una técnica así como el resto de parámetros considerados son otra forma de estimar la factibilidad del proceso quirúrgico. Los valores contrarios en cada una de las variables mencionadas llevaron a aceptar la hipótesis nula, excepto cuando se daba un valor de factibilidad 3 (posible con algunas incidencias graves en la ejecución) o un valor de efectividad 0 (ninguno, la fistula no experimenta cambios), casos en los que era posible buscar una solución. En el caso de efectividad cero se hacía un análisis comparativo con los casos previos para identificar una causa, si se lograba la identificación del problema se diseñaba un paso nuevo que abordara esa dificultad. Ese paso nuevo debía probarse en los siguientes casos donde se ensayara la técnica y si volviera a ser cero se rechazaría definitivamente la hipótesis principal. Por el contrario, si se lograba en los sucesivos casos un cierre total o parcial se aceptaría la hipótesis principal.

La forma habitual de evaluar los procedimientos quirúrgicos es de forma indirecta a través de sus resultados: la tasa de infección, la tasa de reintervenciones, la tasa de reingresos, la tasa de dehiscencia de la herida, el tiempo de supervivencia en los tumores malignos, la tasa de mortalidad, de morbilidad, de efectividad en corregir el problema objeto de la cirugía, las encuestas de calidad de vida y otros. La estimación de la bondad de una técnica quirúrgica por todos estos criterios suele ser difícil por la cantidad de variables implicadas en los resultados. Así un paciente puede tener un curso postoperatorio complicado a pesar de aplicar una técnica quirúrgica correcta y eficaz, debido a las comorbilidades asociadas, o puede tener una evolución favorable, a pesar de haberse aplicado un procedimiento quirúrgico ineficaz. En todas esas

circunstancias un estudio con un grupo control es lo más eficaz para evitar la confusión por las numerosas variables. Pocas veces se analiza el procedimiento quirúrgico en si mismo. Cuando esto se hace las variables que clásicamente se suelen medir son el tiempo de ejecución, la cuantía de sangrado, y las tasas de reconversión, principalmente. Esta ultima ha sido muy usada para validar técnicas quirúrgicas endoscópicas. Esta tasa mide el numero de veces que se intenta realizar un procedimiento por cirugía mínimamente invasiva y por dificultades técnicas o episodios hemorrágicos hay que convertirlos en cirugía abierta estándar.

Aquí por primera vez (hasta donde llegan nuestros conocimientos), al descomponer la intervención en sus pasos esenciales y aplicarles una escala de factibilidad y complejidad a cada escalón, hemos trasladado la evaluación al propio proceso quirúrgico, evitando valoraciones indirectas, mas sometidas a las influencias de distintas variables. Nos hemos centrado así en la propia técnica quirúrgica, que era lo que se buscaba. Creemos que esta forma de proceder, la metodología desarrollada, puede tener una aplicación muy amplia para evaluar técnicas quirúrgicas nuevas e incluso permitir la comparación entre técnicas quirúrgicas ya bien establecidas sin tener que recurrir a otros resultados.

¿Cuáles son las limitaciones de nuestra metodología?. ¿Qué posibilidades hay de que hayamos aceptado H1 y en realidad no sea una técnica factible, fácil, segura y efectiva?. Las probabilidades de que se de este falso positivo las consideramos muy bajas, ya que es realmente muy improbable que en fistulas bien establecidas donde han fracasado las medidas quirúrgicas estándar o no son aplicables resulte un resultado favorable a pesar de que la nueva técnica no sea efectiva. ¿Que probabilidades había si los resultados de aplicar esta metodología hubieran sido negativos de descartar una técnica quirúrgica endoscópica como ineficaz cuando en realidad si es valida, es decir que se diera un falso negativo?. Este resultado tiene mas probabilidades de ocurrir. Se daría si la infactibilidad de la técnica se debiera a impericia, mala ejecución de la misma o inicio de la curva de aprendizaje por parte del cirujano y no a ella *per se*. También llevaría a error si el procedimiento quirúrgico se descarta por ineficaz, y en realidad las que están siendo ineficaces son las células troncales mesenquimales de origen adipogénico (VSF o ASCs expandidas).

B. Discusión de los resultados

Podemos afirmar que, por primera vez, se ha logrado desarrollar una técnica quirúrgica endoscópica de terapia celular e ingeniería tisular con ASCs para el tratamiento de las fístulas traqueo-bronquiales, cuando están bien establecidas con cualquier otro espacio adyacente, mediastino, esófago o cavidad pleural, en las que habían fracasado las terapias habituales o no eran aplicables. Así, el procedimiento diseñado ha resultado factible, de fácil ejecución, seguro, sin complicaciones ni efectos adversos y eficaz. Se ha logrado una efectividad del 80% en el cierre parcial o total de las fístulas traqueo-bronquiales. Si excluimos las fístulas traqueo-esofágicas o bronco-esofágicas, la curación de la fístula y su cierre con epitelización completa se logró en un 100% (n=3/3). Este resultado positivo es más llamativo cuando se produce en pacientes con fístulas bien establecidas, en los que habían fracasado los tratamientos, las técnicas quirúrgicas o los procedimientos endoscópicos (endoprótesis) habituales. La mayoría de los pacientes sufrían de pluripatología, dos pacientes (primero y tercero) de radioterapia complementaria a nivel mediastínico, que les impedía beneficiarse de los procedimientos quirúrgicos ortodoxos. El primer paciente recibió también quimioterapia. En este paciente los riesgos de fallecer por una hemoptisis masiva eran muy altos. Todos los casos registrados en la literatura médica fallecieron por hemorragia secundaria a erosión de un gran vaso por la fístula. En este sentido se puede afirmar que el tratamiento endoscópico aplicado con terapia celular e ingeniería tisular resultó salvador. Dado lo relevante de los resultados, estos fueron publicados previamente por el autor de la tesis¹²⁰. Las fístulas esófago-traqueales y esófago-bronquiales han sido las más difíciles de tratar, lográndose una respuesta parcial en el 50% (artículo aceptado en octubre de 2015 por la revista *Cytotherapy*).

Como consecuencia de aplicar la metodología basada en los algoritmos de planificación, factibilidad, complejidad, seguridad, efectividad y perfeccionamiento se pudo ajustar y validar la técnica endoscópica quirúrgica de terapia celular e ingeniería tisular. En ese ajuste los seis pasos esenciales o críticos, inicialmente planificados, pasaron a ser ocho por la introducción de dos nuevos pasos: la ablación de la mucosa con electrocoagulación de argón-plasma y la ablación mecánica de la mucosa con

curetas de 5 mm desde el lado pleural. Es obvio que debemos sumar a la curva de aprendizaje quirúrgica la curva de aprendizaje de la manipulación del medicamento vivo. El único fallo de curación se dio en el segundo paciente, donde no se realizó la ablación de la mucosa, ya que ese paso no se había desarrollado. Fue el análisis comparativo entre el segundo y el primer caso lo que llevó a identificar la existencia de un epitelio integro como una barrera tisular infranqueable para la acción de las ASCs. La desepitelización de la mucosa bronquial ya había sido descrita por otros autores en el tratamiento de las FBP. Esto usaban el laser para acometer la destrucción de la mucosa, procedimiento que se descartó para evitar el daño térmico que causa el laser en la pared bronquial. De ahí que se buscara una técnica endoscópica que permitiera la ablación de la mucosa sin causar un daño térmico a la pared bronquial. La solución se encontró en la electrocoagulación con argón-plasma que tiene sondas de aplicación que pasan por el canal de trabajo de los endoscopios. Esta técnica de ablación está ampliamente contrastada en endoscopia digestiva, donde es una técnica plenamente establecida para el tratamiento de lesiones de la mucosa de aparato digestivo. Una característica determinante para la elección de la electrocoagulación por argón-plasma como método de ablación fue que su acción térmica se limita a los primeros milímetros de la mucosa, sin afectar al resto de la pared bronquial. A partir de la introducción de este paso no se produjo ningún fallo de cicatrización completo. Esta solución de realizar un segundo tratamiento se le propuso al segundo paciente, ya que el protocolo lo permitía, pero el paciente rechazó el procedimiento y decidió salirse del estudio.

El octavo paso introducido es una consecuencia lógica del paso siete, la ablación de la mucosa, cuando se traslada el mismo concepto de desepitelización al lado pleural. Para la ablación del epitelio o mucosa desde el lado pleural se escogió un método mecánico, consistente en el legrado con curetas de la boca de la fístula. La eficacia de este paso es difícil de juzgar, ya que solo se hizo en dos casos, uno con cicatrización completa y otro sólo con parcial.

Es difícil estimar cual fue la repercusión de la modificación del paso crítico número seis, que implicaba el refuerzo del bloqueo con el adhesivo de fibrina mediante

la adicción de tres puntos de sutura trenzada reabsorbible de 3/0 de poliglactin 910 (Vicryl®). Estos puntos se dieron aprovechando la toracostomía abierta que portaban ambos pacientes. Con estos puntos no se buscó hacer una aposición de los bordes de la fístula, sino solo una reducción de su diámetro y un apoyo físico para que el coágulo de fibrina fuera más estable. Los puntos se anudaban después de aplicada la cola de fibrina. Esta modificación fue la única adaptación implementada que se practicó en los casos tercero y quinto, funcionando en uno si y en otro no, impidiendo sacar cualquier conclusión.

Para lograr el cierre de la fístula en dos pacientes fue suficiente con una aplicación de la fracción vículo-estromal (casos uno y cuatro), en otros dos pacientes se realizaron dos aplicaciones y en el segundo caso sólo se aplicó una vez. Tras el fallo de cicatrización con el primer tratamiento no fue posible planificar un segundo ya que, como se ha comentado, el paciente decidió retirarse del estudio. Dos de los pacientes, cumplieron los criterios del protocolo para plantear un segundo tratamiento y así se hizo, los pacientes que recibieron dos tratamientos fueron el tercero y el quinto. En el tercer paciente, tras una buena respuesta con cierre parcial después de aplicar el primer tratamiento, se realizó un segundo tratamiento que permitió alcanzar el cierre completo de la fístula. En el quinto paciente el devenir de la fístula con el segundo tratamiento no fue tan favorable, esto es, tras experimentar una respuesta parcial después del primer tratamiento con ASCs expandidas, la segunda aplicación no logró mejorar la respuesta que fue de nuevo parcial sin llegar a un cierre completo.

Hubo una serie de pasos que durante la fase de planificación se contraindicó su ejecución y por tanto se obviaron. Así en el primer paciente no se planificó la inyección intersticial en las paredes de la fístula por la proximidad de los grandes vasos mediastínicos. En concreto, en este paciente, la VCS se situaba en la proximidad de la fístula, por lo que se considero que existía riesgo de hemorragia o de aplicación intravascular de las células, circunstancia que no se contemplaba en el protocolo, por tanto se omitió la inyección intersticial. En el segundo caso la aplicación de las células sólo se hizo desde el lado esofágico, ya que de acuerdo con el protocolo se planificó

mantener la endoprótesis que portaba el paciente en el lado traqueal, para evitar riesgos de aspiración pulmonar. En el cuarto paciente tampoco se hizo la aplicación desde el lado pleural, al no ser posible su identificación de una forma apropiada con el endoscopio flexible por toracoscopia, realizada a través de la toracostomía cerrada. Aunque la aplicación del tratamiento en los dos lados de la fístula se consideró teóricamente como el más eficaz, en estos tres casos sólo se realizó la aplicación desde un lado. Cuando se hizo desde la luz de la vía aérea en los pacientes primero y cuarto no se produjo ningún fallo de cicatrización y si se produjo en el paciente con fístula esófago-traqueal. Los tres casos son muy puntuales para sacar conclusiones, pero cabe especular que la aplicación en un solo lado de la fístula cuando se hace desde el lado bronquial no impide obtener buenos resultados, ya que en esos dos pacientes sus fístulas cerraron al 100%. Tampoco parece ser un obstáculo para lograr la curación que en el primer paciente no se hiciera aplicación de la fracción vásculo-estromal en el compartimento intersticial por el riesgo de hemorragia.

Si nos fijamos en la factibilidad de los diferentes pasos, el primer paso, el proceso de lipoaspirado y la obtención de la fracción vásculo-estromal, su ejecución y resultado siempre obtuvo la calificación de excelente. En los dos casos que se habían sometido a expansión las células, cuando se planteó un segundo tratamiento no fue necesario repetir el proceso de lipoaspirado, porque en el laboratorio de producción celular en las dos ocasiones quedaron almacenadas en criopreservación parte de las células extraídas en la primera lipoaspiración, para poder planificar un segundo tratamiento. Esto es sin duda una ventaja que tiene la aplicación diferida después de expansión frente a la utilización directa de la fracción vásculo-estromal.

La factibilidad para identificar la fístula por broncoscopia y esofagoscopia siempre fue excelente, excepto en el último paciente en el que, por la distorsión anatómica que producía la toracostomía abierta, la identificación de la fístula por el lado pleuro-esofágico fue más difícil y en consecuencia recibió la calificación de fácil. La factibilidad para identificar la fístula en la cavidad pleural (toracoscopia), estuvo condicionada a la existencia previa de una toracostomía abierta. Cuando la

toracostomía fue cerrada su identificación no fue factible, debido a la presencia de esfacelos fibrosos en la cavidad pleural, cuya retirada no era posible.

El otro paso que no logró la calificación de excelente, obteniendo en todos los casos la calificación de fácil, fue el bloqueo del trayecto fistuloso con el adhesivo de fibrina. Todas las veces el volumen del adhesivo fue superior al volumen del trayecto de la fístula, por lo que parte del adhesivo se derramó fuera del trayecto fistuloso. En el primer caso esto ocurrió favorecido por la acción de la gravedad, pero en el resto de las fístulas ocurrió por la disparidad entre el volumen inyectado y el volumen de la fístula. Esta disparidad tuvo dos consecuencias que no parecen haber condicionado el devenir de los pacientes: la primera es la pérdida de un porcentaje no cuantificable de las ASCs y la segunda la necesidad de retirar el volumen del adhesivo que quedó en posición intraluminal, dentro de la luz traqueal o bronquial, para que no fuera causa de obstrucción de la vía aérea. En el tercer paciente no fue necesaria su retirada ya que tenía una neumonectomía izquierda y el coágulo de fibrina en la luz del muñón de neumonectomía no suponía ningún riesgo de obstrucción.

Respecto a la complejidad de la técnica diseñada, ninguno de los pasos críticos, ya fueran o no adaptados, ni los pasos nuevos introducidos como consecuencia de aplicar el algoritmo de perfeccionamiento superaron en su ejecución los 60 minutos o más, tiempo que se había fijado de una forma empírica como límite para considerar factible la ejecución de la técnica. Sí nos fijamos con más detalle en los tiempos de realización de los pasos críticos vemos que en los pacientes tercero y quinto el tiempo de la aplicación de las ASCs fue muy superior al resto de los casos, arrojando una media de 129 minutos frente a los 82 minutos que llevo la aplicación en los demás pacientes. Esta diferencia se debe, a que la aplicación de las células se hizo doble, a nivel bronquial y pleural en el tercer paciente y a nivel bronquial y esofágico en el quinto paciente, ya que ambos pacientes tenían realizada previamente una toracostomía abierta. Para hacer la aplicación celular en los dos espacios hubo que cambiar al paciente de posición en la mesa de quirófano durante la intervención, desde decúbito supino, posición en la que se coloca el sujeto para abordar el árbol traqueobronquial, a la posición de decúbito lateral

derecho, para abordar por el costado izquierdo la cavidad pleural, ya que en los dos pacientes había una toracostomía abierta en el hemitórax izquierdo.

Si nos fijamos en los instrumentos usados para aplicar la técnica endoscópica quirúrgica vemos que casi todos ellos obtuvieron calificaciones de excelentes, pero eso no ocurrió siempre. Esto fue lo que ocurrió cuando se manejaron las agujas curvas de la sutura de poliglactin (Vicryl®) con el porta endoscopio a través del toracostoma abierto. La instrumentación de los mismos no resultó cómoda al cirujano, aunque pudo realizar la tarea, por lo que se les dio el calificativo de fáciles y no excelentes. El cirujano no supo definir si esa dificultad se hubiera superado con un diseño más favorable de los mismos o bien la sensación era debida a una falta de entrenamiento en su práctica. Es decir, una mayor experiencia con este paso habría solucionado esa falta de adecuación. El otro instrumento calificado muchas veces como fácil en lugar de excelente fue la sonda de electrocoagulación de argón-plasma. Esta puntuación se debió a que cuando se quiso aplicar con precisión la sonda en los distintos puntos de la fístula para hacer una ablación completa de toda la mucosa, en muchos de los casos hubo que hacer más de un intento, con cambios en la posición del endoscopio para aplicar la sonda en el punto seleccionado. Nuevamente fue difícil para el cirujano interpretar si ese exceso de gestos se hubieran corregido con un aprendizaje más prolongado de la técnica.

Durante la anestesia no se dieron dificultades de ventilación. Esto se vio facilitado porque antes de cada paso el paciente era llevado a una posición óptima de saturación de oxígeno al 100%. Tampoco se dieron circunstancias de aspiración pulmonar por la práctica del procedimiento, sin duda las medidas preventivas que se tomaron en todos los casos impidieron que se diera este hecho.

Como consecuencia de la realización de la técnica descrita solo se registraron dos complicaciones en dos pacientes diferentes. Una fue una complicación intraoperatoria, ocurrida durante la lipoaspiración en el segundo caso, cuando el paciente presentó una subida de la tensión arterial diastólica y sistólica por reflejo ante el dolor mientras se realizaba el procedimiento. Esta elevación tensional se corrigió fácilmente con el incremento de la analgesia mediante la inyección IV de 2 gr de metamizol. Esta

complicación se puntuó como de grado 2 (menos graves, alteraciones de las constantes o complicaciones que precisaron de una actuación terapéutica para su corrección). La otra complicación se dio en el cuarto paciente, al cual se le produjo una infección de la herida cutánea en los puntos de entrada donde se realizó la lipoaspiración. La complicación se graduó como tipo I de la clasificación de Clavien-Dindo. Se controló con la administración de antibioterapia IV, resolviéndose en pocos días. La mortalidad intraoperatoria, postoperatoria a los treinta días y la mortalidad tardía en los 3 primeros meses fue cero, a pesar de la complejidad de los pacientes tratados.

Durante el periodo de seguimiento (entre 4 y 10 años) no se detectó ningún efecto adverso atribuible a la técnica quirúrgica o a la utilización de las células troncales procedentes del lipoaspirado o a la ingeniería tisular practicada, resultados concordantes con otros estudios^{106, 107, 109, 121}. Se hizo un seguimiento de años a los pacientes que se sacaron del estudio, para detectar si se producían efectos adversos a largo plazo. Aunque las células troncales mesenquimales siempre se han mostrado seguras y solo las células troncales embrionarias se han comportado como teratogénicas, se hizo un seguimiento específico de los tres pacientes con antecedentes de neoplasias malignas, ya que la ASCs son angiogénicas y a través de ese efecto pueden promover los tumores. En su seguimiento uno desarrolló metástasis cerebrales, falleciendo a los 48 meses de la aplicación de las ASCs por progresión de estas metástasis. Otro paciente, el primer caso, desarrolló un nuevo carcinoma *in situ* en la carina traqueal a los cinco años de la implantación de las células troncales, siendo tratado nuevamente con láser y lográndose una remisión completa que se mantiene hasta la fecha. Ese mismo paciente desarrolló un nódulo pulmonar periférico maligno a los 6 años de la terapia con ASCs. Esta vez la lesión fue tratada con radiofrecuencia, alcanzándose una vez más una remisión completa y permaneciendo en la actualidad sin signos de recurrencia de su enfermedad neoplásica, ya con diez años de seguimiento. El cuarto paciente que tenía también como antecedente una neoplasia de pulmón, permanece sin signos de reproducción de su enfermedad 48 meses después del tratamiento de su fístula con ASCs. La evolución que experimentaron estos pacientes no

difiere de la historia natural del cáncer de pulmón, ya que evidentemente el tratamiento con terapia celular e ingeniería tisular no ha evitado la recurrencia de su enfermedad o la aparición de segundos primarios. Como entre los episodios de recurrencia de su neoplasia no se encuentra relación temporal con la aplicación de ASCs, podemos decir que la terapia con células troncales mesenquimales procedentes de la grasa no promueve las neoplasias y es segura cuando se aplica a pacientes oncológicos. Esta afirmación viene apoyada por los resultados de muchos ensayos clínicos⁵³ y estudios como el de Andriani et al¹²².

Como exponíamos al principio de esta discusión, la eficacia de la técnica de terapia celular e ingeniería tisular con aplicación de ASCs en la cicatrización de las fístulas de la vía aérea bien establecidas ha sido de un 80%. El grado de cierre ha sido de un 100% con reepitelización completa en la fístula mediastínica y en las dos fístulas postquirúrgicas, una fístula postneumonectomía y otra postlobectomía. La eficacia de la técnica decae cuando analizamos las fístulas traqueales o bronquiales con el esófago. El porcentaje de curación, es decir de cierre, en la fístula esófago-bronquial fue de un 80% y en la fístula esófago-traqueal de un 0%, tras darse una ausencia completa de respuesta. Se ve claramente que la eficacia en lograr la cicatrización ha dependido fundamentalmente del tipo de fístula así como de la curva de aprendizaje de su manipulación. Las fístulas entre la vía aérea y el esófago han mostrado resistencia a la curación al aplicar nuestra técnica de medicina regenerativa. No es fácil concretar cuáles han podido ser las circunstancias que han hecho que nuestra técnica fuera exitosa en las fístulas del árbol traqueo-bronquial y que fracasara sin embargo en las fístulas esófago-traqueales o esófago-bronquiales, donde en ninguna de las dos tratadas se alcanzó el cierre completo. Desconocemos cuál habría sido el resultado en el segundo paciente si hubiera aceptado un segundo tratamiento con ablación de la mucosa esófago-bronquial. Aunque estas conclusiones deben considerarse en el contexto del bajo número de pacientes tratados, así como de las diferencias durante los tratamientos, tanto en el desarrollo de la técnica quirúrgica como el tamaño o tipo de la fístula y del tipo celular aplicado (SVF o ASCs).

El tamaño de la fístula no parece haber sido tan determinante como el tipo de fístula. Así el tamaño de la fístula entre las que cicatrizaron fue de 12-14 mm en la fístula tráqueo-mediastínica, 4 mm en la situada en el muñón de neumonectomía y 3 mm la situada en el bronquio intermediario frente a 3 mm de la fístula esófago-traqueal y otros 3 mm de la fístula esófago-bronquial. No se pueden extraer conclusiones.

En cuanto al tipo de aplicación directa con la fracción vásculo-estromal o diferida tras expansión, también es difícil extraer conclusiones. Se puede decir que la dosis mas reducida de células troncales mesenquimales presentes en la fracción vásculo-estromal (sólo un 3-5% de las células son CTM, datos no publicados) no parece haber impedido obtener resultados satisfactorios en las fístulas tráqueo-mediastínicas o bronco-pleurales. Por contra la aplicación de entre 20-40 millones de ASCs en la fístulas que interesan el esófago no parece ser suficiente para lograr la cicatrización completa de ese tipo de fístulas. Pro todo ello parece aconsejable realizar una curva de dosis una vez ajustados el resto de parámetros.

El adhesivo de fibrina jugo un papel triple, al ser a la vez vehículo para transportar las células al trayecto fistuloso, actuar como matriz extracelular provisional para dar soporte a las células aplicadas y por ultimo como adhesivo que bloqueaba la luz de la fístula. Como vehículo su función fue muy adecuada y sus mayores desventajas fueron su reabsorción muy rápida y su falta de dureza para resistir los cambios de presión generados en el trayecto de la fístula por el mecanismo de la tos. Existen muchos casos clínicos en la literatura médica donde se constata el cierre de las fístulas bronco-pleurales tras la aplicación por broncoscopia del adhesivo de fibrina. Si dejamos de lado estas publicaciones de casos únicos y nos fijamos en las series de casos publicadas, la más grande es la de Hollaus et al¹²³ de 45 pacientes con fístula bronco-pleural tratados con broncoscopia. A través del broncoscopio instilaron el adhesivo de fibrina en el trayecto de la fístula y practicaron aplicaciones repetidas de la fibrina. Lograron el cierre completo de la fístula en 9 pacientes de 45 (un 20%), con una mortalidad global de un 57%. Es más ilustrativo si analizamos los resultados del trabajo de West²² que hace una revisión de la literatura médica entre los años 1957-1980 y 2007 de las bases de

datos *Medline* y *EMBASE* utilizando un protocolo basado en los principios de la medicina basada en la evidencia. Rescataron 85 trabajos sobre fístulas bronco-pleurales postneumonectomía tratadas con broncoscopia. Los procedimientos broncoscópicos resultaron efectivos en un 30% de la fístulas, con una mortalidad global del 40%. Aunque el número de pacientes de nuestra serie es muy pequeño para establecer conclusiones, la cifra de efectividad de un 100% en las fístulas bronco-pleurales con una mortalidad de un 0% está muy alejada de las obtenidas en los tratamientos endoscópicos con diferentes sustancias. Se puede deducir que la adición de células troncales mesenquimales al adhesivo de fibrina ha mejorado notablemente la efectividad de este.

Estos datos tan prometedores nos han llevado a desarrollar un ensayo clínico específico dirigido al tratamiento de la fístulas bronco-pleurales con células troncales mesenquimales derivadas de la grasa expandidas, que ha sido aprobado por la AEMPS con el código HULPTOR-2011-01. El ensayo esta abierto, ya que no ha concluido todavía el periodo de reclutamiento de pacientes.

Aunque los datos tendrán que confirmarse con el estudio en curso y series más amplias, los resultados iniciales indican que las células troncales mesenquimales procedentes de la grasa favorecen la cicatrización de las fístulas bronco-pleurales. Sin embargo, desconocemos cuales han sido los mecanismos por los que dichas células han ejercido su efecto cicatrizante. La metodología aplicada no perseguía contestar a esas cuestiones. Existe una extensa bibliografía que analiza los efectos terapéuticos de las células mesenquimales tanto de origen adipogénico como de la médula ósea^{79, 109, 124-126}. Así mismo hay muchas evidencias de que las células troncales mesenquimales participan tanto en el proceso de cicatrización de las heridas, aceleran su velocidad de curación, como al mismo tiempo incrementan su fuerza tensional¹²⁷⁻¹²⁹. Se ha estudiado mucho cuales son los posibles mecanismos por los que las ASCs promueven la cicatrización y, aunque no están completamente dilucidados, se han considerado como implicados varios. Así a través de la diferenciación de las ASCs en distintas células que toman parte en la regeneración de las heridas y, el principal, por sus efectos paracrinos,

a través de señales celulares, secreción de factores de crecimiento, citoquinas y cimoquinas. Estos factores de crecimiento y citoquinas promueven la regeneración de los tejidos e inhiben la apoptosis, siendo inmunomoduladores y angiogénicos¹¹¹. Se ha constatado, además, que tienen actividad antimicrobiana, lo que es muy importante para contener o eliminar la infección de las heridas. Su acción antiinflamatoria permite que en heridas crónicas éstas superen la fase inflamatoria conduciéndolas a fases mas avanzadas de la cicatrización y a su curación.

Independientemente de todas las dudas respecto a las variables implicadas en los resultados obtenidos, lo que puede afirmarse es que la técnica diseñada de terapia celular e ingeniería tisular con ASCs ha resultado factible, fácil, segura y eficaz. La validez de estos resultados tendrá sin duda que confirmarse con otros muchos estudios que confirmen estos resultados.

De los cinco pacientes tratados, tres han sido objeto de publicaciones. Tras la publicación del primer caso¹²⁰ diferentes autores han seguido la línea de investigación iniciada por nuestro equipo con la aplicación de células troncales para la cicatrización del tejido bronquial.

Recientemente Petrella et al¹³⁰ ha tratado con CTM una fístula de neumonectomía derecha extrapleural. Esta se había realizado para resecar un mesotelioma pleural maligno. Como en nuestra serie se empleó la broncoscopia para inyectar 10 millones de CTM. Hicieron una única inyección en la membrana del BPD. A los 60 días de la aplicación la fístula había cicatrizado por completo. La única diferencia con nuestro procedimiento fue que ellos, como fuente de células troncales mesenquimales usaron las células troncales procedentes de los aspirados de médula ósea, en lugar de las procedentes del lipoaspirado.

Nuestro trabajo ha permitido definir mejor las indicaciones terapéuticas de las células troncales mesenquimales procedentes de la grasa, así como planificar nuevos tratamiento de terapia celular e ingeniería tisular. Así y como consecuencia de todo ello hemos sido citados por un total de 16 publicaciones entre trabajos originales y revisiones¹³⁰.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. En este trabajo ha sido factible desarrollar una técnica quirúrgica endoscópica para el tratamiento de las fistulas traqueo-bronquiales con terapia celular e ingeniería tisular.
2. Se ha logrado desarrollar un algoritmo de decisión para validar los pasos quirúrgicos de la técnica diseñada, permitiendo al mismo tiempo introducir modificaciones de una forma dinámica para ajustar dicha técnica.
3. Este algoritmo podría ser aplicable en la evaluación de otros procedimientos quirúrgicos, tanto en los ya establecidos, en evolución o en fase de introducción.
4. Esta técnica ha constado de seis pasos críticos esenciales, valorados todos ellos mediante un algoritmo de planificación, factibilidad, complejidad, efectividad, seguridad y perfeccionamiento respectivamente.
5. La aplicación del algoritmo de perfeccionamiento permitió introducir dos nuevos pasos y la modificación de un paso previo crítico.
6. El procedimiento diseñado ha resultado factible y sencillo en su ejecución.
7. En los casos tratados de fístulas traqueo-bronquiales el procedimiento quirúrgico diseñado ha sido seguro, sin complicaciones y sin efectos adversos significativos.
8. La aplicación de las células troncales mesenquimales autólogas procedentes de la grasa ha mostrado ser una terapia segura sin efectos adversos significativos.
9. Esta terapia ha mostrado una eficacia consistente en un cierre completo de la fístula en 3 pacientes, un cierre del 80% en un 4º paciente y en un fallo de curación en un único paciente.
10. Las células troncales mesenquimales procedentes de la grasa aplicadas en casos en que no han respondido a otras terapias establecidas o sin opciones de tratamiento claras, han ejercido un efecto beneficioso en la cicatrización y curación de las fístulas tráqueo-medistínicas y de las fístulas bronco-pleurales del muñón de resección pulmonar.

VII. CLAVES DE ABREVIATURAS

VII. CLAVES DE ABREVIATURAS

3D: tres dimensiones

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

ASCs: *Adipose-derived stem cells*

BPD: Bronquio principal derecho

BPI: Bronquio principal izquierdo

CTM: células troncales mesenquimales

FBP: Fístula bronco-pleural

FVE: Fracción vasculo-estromal

Gy: Gray, dosis de radiación absorbida, 1 Gy= 0,01J/kg

HULP: Hospital Universitario La Paz

HSCs: *Hematopoietic stem cells*

IPS: *Inducted Pluripotent Cells*

IV: intravenosa

MCI: masa celular interna

MSCs: *Mesenchymal stem cells*

PCL: *Polycaprolactone*

PDGF: *Platelet-derived growth factor*

PEG: *Polyethylene glycol*

PET: *Positron Emission Tomography*

PGA: *Polyglycolic acid*

PLA: *Poly-lactic acid*

PLLA: *Poly-L-lactic acid*

PLGA: *Poly (lactide-co-glycolide) acid*

VCS: Vena cava superior

VEFG: *Vascular endothelial growth factor*

USA: *United States of America*

VII. CLAVES DE ABREVIATURAS

VIII. BIBLIOGRAFIA

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Moody GN, Zeno BR. Localization and treatment of bronchopleural fistula through capnography. *J Bronchology Interv Pulmonol* 2010;17:261-3.
2. Duque JL, Ramos G, Castrodeza J, Cerezal J, Castanedo M, Yuste MG, et al. Early complications in surgical treatment of lung cancer: a prospective, multicenter study. Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogenico de la Sociedad Espanola de Neumologia y Cirugia Toracica. *Ann Thorac Surg* 1997;63:944-50.
3. Algar FJ, Alvarez A, Aranda JL, Salvatierra A, Baamonde C, Lopez-Pujol FJ. Prediction of early bronchopleural fistula after pneumonectomy: a multivariate analysis. *Ann Thorac Surg* 2001;72:1662-7.
4. Sirbu H, Busch T, Aleksic I, Schreiner W, Oster O, Dalichau H. Bronchopleural fistula in the surgery of non-small cell lung cancer: incidence, risk factors, and management. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2001;7:330-6.
5. Deschamps C, Bernard A, Nichols FC, 3rd, Allen MS, Miller DL, Trastek VF, et al. Empyema and bronchopleural fistula after pneumonectomy: factors affecting incidence. *Ann Thorac Surg* 2001;72:243-7; discussion 8.
6. Pforr A, Pages PB, Baste JM, Thomas P, Falcoz PE, Lepimpec Barthes F, et al. A Predictive Score for Bronchopleural Fistula Established Using the French Database Epithor. *Ann Thorac Surg* 2015.
7. Asamura H, Naruke T, Tsuchiya R, Goya T, Kondo H, Suemasu K. Bronchopleural fistulas associated with lung cancer operations. Univariate and multivariate analysis of risk factors, management, and outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:1456-64.
8. Darling GE, Abdurahman A, Yi QL, Johnston M, Waddell TK, Pierre A, et al. Risk of a right pneumonectomy: role of bronchopleural fistula. *Ann Thorac Surg* 2005;79:433-7.
9. Thomas PA, Berbis J, Baste JM, Le Pimpec-Barthes F, Tronc F, Falcoz PE, et al. Pneumonectomy for lung cancer: contemporary national early morbidity and mortality outcomes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015;149:73-82.
10. Pomerantz M, Madsen L, Goble M, Iseman M. Surgical management of resistant mycobacterial tuberculosis and other mycobacterial pulmonary infections. *Ann Thorac Surg* 1991;52:1108-11; discussion 12.
11. Petrella F, Toffalorio F, Brizzola S, De Pas TM, Rizzo S, Barberis M, et al. Stem cell transplantation effectively occludes bronchopleural fistula in an animal model. *Ann Thorac Surg* 2014;97:480-3.
12. Hollaus PH, Lax F, el-Nashef BB, Hauck HH, Lucciarini P, Pridun NS. Natural history of bronchopleural fistula after pneumonectomy: a review of 96 cases. *Ann Thorac Surg* 1997;63:1391-6; discussion 6-7.
13. Ost D, Goldberg J, Rolnitzky L, Rom WN. Survival after surgery in stage IA and IB non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:516-23.
14. Wright CD, Wain JC, Mathisen DJ, Grillo HC. Postpneumonectomy bronchopleural fistula after sutured bronchial closure: incidence, risk factors, and management. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:1367-71.
15. Epstein SK. Late complications of tracheostomy. *Respir Care* 2005;50:542-9.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

16. Sanwal MK, Ganjoo P, Tandon MS. Posttracheostomy tracheoesophageal fistula. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 2012;28:140-1.
17. Maruti Pol M, Gupta A, Kumar S, Mishra B. Innominate artery injury: a catastrophic complication of tracheostomy, operative procedure revisited. *BMJ Case Rep* 2014;2014.
18. Ucer M, Ordu C, Pilanc KN, Dalar L. Tracheomediastinal fistula in a patient with lung adenocarcinoma and its treatment with argon plasma coagulation: a case report. *Medicine (Baltimore)* 2014;93:e156.
19. Van Schil PE, Hendriks JM, Lauwers P. Focus on treatment complications and optimal management surgery. *Transl Lung Cancer Res* 2014;3:181-6.
20. Lois M, Noppen M. Bronchopleural fistulas: an overview of the problem with special focus on endoscopic management. *Chest* 2005;128:3955-65.
21. Yamamoto S, Endo S, Minegishi K, Shibano T, Nakano T, Tetsuka K. Polyglycolic acid mesh occlusion for postoperative bronchopleural fistula. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2015;23:931-6.
22. West D, Togo A, Kirk AJ. Are bronchoscopic approaches to post-pneumonectomy bronchopleural fistula an effective alternative to repeat thoracotomy? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2007;6:547-50.
23. Cardillo G, Carbone L, Carleo F, Galluccio G, Di Martino M, Giunti R, et al. The Rationale for Treatment of Postresectional Bronchopleural Fistula: Analysis of 52 Patients. *Ann Thorac Surg* 2015;100:251-7.
24. Wang CY, Chou CH, Wang HP, Chen JS, Lee P. Successful treatment of bronchoesophageal fistula with esophageal and bronchial stenting. *J Formos Med Assoc* 2011;110:270-2.
25. Muraca M, Galbiati G, Realdi G, Vilei MT, Fabricio AS, Caruso M. Regenerative medicine: an insight. *Transplant Proc* 2007;39:1995-8.
26. Haseltine WA. Interview: commercial translation of cell-based therapies and regenerative medicine: learning by experience. Interview by Emily Culme-Seymour. *Regen Med* 2011;6:431-5.
27. Daar AS, Greenwood HL. A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1:179-84.
28. Greenwood HL, Singer PA, Downey GP, Martin DK, Thorsteinsdottir H, Daar AS. Regenerative medicine and the developing world. *PLoS Med* 2006;3:e381.
29. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* 2008;3:1-5.
30. Williams J, Petersen B. Origin, Evolution, and Direction of Human Somatic Cell Therapy. In: Garcia Olmo D, Garcia-Verdugo J, Alemany J, Gutierrez-Fuentes J, eds. *Cell Therapy*. Madrid, Spain: McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U., 2008.
31. Anonymous. Current good tissue practice for human cell, tissue, and cellular and tissue-based product establishments; inspection and enforcement. Final rule. *Fed Regist* 2004;69:68611-88.
32. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257:491-6.
33. Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994;330:827-38.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

34. Gratwohl A, Baldomero H. Trends of hematopoietic stem cell transplantation in the third millennium. *Curr Opin Hematol* 2009;16:420-6.
35. Jungebluth P, Macchiarini P. Stem cell-based therapy and regenerative approaches to diseases of the respiratory system. *Brit Med Bull* 2011;99:169-87.
36. Nerem RM. Regenerative medicine: the emergence of an industry. *J R Soc Interface* 2010;7 Suppl 6:S771-5.
37. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-6.
38. Badylak SF, Weiss DJ, Caplan A, Macchiarini P. Engineered whole organs and complex tissues. *The Lancet* 2012;379:943-52.
39. Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc Interface* 2007;4:999-1030.
40. Kim I, Lee SK, Yoon JI, Kim da E, Kim M, Ha H. Fibrin glue improves the therapeutic effect of MSCs by sustaining survival and paracrine function. *Tissue Eng Part A* 2013;19:2373-81.
41. Hong JK, Madhally SV. Next generation of electrosprayed fibers for tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17:125-42.
42. Jakab K, Norotte C, Marga F, Murphy K, Vunjak-Novakovic G, Forgacs G. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication* 2010;2:022001.
43. Biondi M, Ungaro F, Quaglia F, Netti PA. Controlled drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:229-42.
44. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 2010;328:1662-8.
45. . Introducción memoria anual de trasplantes. Available at: <http://www.ont.es/infesp/Memorias/MemIntr2011.pdf>.
46. Soria Escoms B. REAL DECRETO 1345/2007, del 11 de octubre. In. Madrid: BOE núm. 267, 2007:45692.
47. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008;2:313-9.
48. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol* 2009;217:144-60.
49. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Ediciones Omega; 2004.
50. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
51. Bonde S, Zavazava N. Immunogenicity and engraftment of mouse embryonic stem cells in allogeneic recipients. *STEM CELLS* 2006;24:2192-201.
52. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer* 2011;11:268-77.
53. Prasongchean W, Ferretti P. Autologous stem cells for personalised medicine. *N Biotechnol* 2012;29:641-50.
54. Escobedo-Lucea C, Bellver C, Gandia C, Sanz-Garcia A, Esteban FJ, Mirabet V, et al. A xenogeneic-free protocol for isolation and expansion of human adipose stem cells for clinical uses. *PloS one* 2013;8:e67870.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

55. Cohnheim J. Über Entzündung und Eiterung. *J Arch Path Anat Physiol Klin Med* 1867;40.
56. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int* 2012;2012:11.
57. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4:267-74.
58. Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater* 2010;20:121-33.
59. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641-50.
60. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
61. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98:2396-402.
62. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235-42.
63. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *STEM CELLS* 2005;23:220-9.
64. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003;102:1548-9.
65. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000;2:477-88.
66. Guo Z, Li H, Li X, Yu X, Wang H, Tang P, et al. In vitro characteristics and in vivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells. *STEM CELLS* 2006;24:992-1000.
67. Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res* 1991;195:492-503.
68. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001;44:1928-42.
69. Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, et al. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:817-27.
70. Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, et al. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* 2004;117:889-97.
71. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-95.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

72. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* 2008;3:301-13.
73. Caplan AI, Hariri R. Body Management: Mesenchymal Stem Cells Control the Internal Regenerator. *Stem Cells Transl Med* 2015;4:695-701.
74. Weiss DJ, Bertoncello I, Borok Z, Kim C, Panoskaltsis-Mortari A, Reynolds S, et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc Am Thorac Soc* 2011;8:223-72.
75. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 2012;49:35-43.
76. Newman RE, Yoo D, LeRoux MA, Danilkovitch-Miagkova A. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009;8:110-23.
77. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* 2011;6:457-78.
78. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:142-9.
79. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:419-27.
80. Cha J, Falanga V. Stem cells in cutaneous wound healing. *Clin Dermatol* 2007;25:73-8.
81. Lau K, Paus R, Tiede S, Day P, Bayat A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp Dermatol* 2009;18:921-33.
82. Sorrell JM, Caplan AI. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Ther* 2010;1:30.
83. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-28.
84. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003;108:863-8.
85. Penn MS. Importance of the SDF-1:CXCR4 axis in myocardial repair. *Circ Res* 2009;104:1133-5.
86. Sieveking DP, Ng MK. Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench. *Vasc Med* 2009;14:153-66.
87. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14:199-215.
88. Anversa P, Perrella MA, Kourembanas S, Choi AM, Loscalzo J. Regenerative pulmonary medicine: potential and promise, pitfalls and challenges. *Eur J Clin Invest* 2012;42:900-13.
89. Chistiakov DA. Endogenous and exogenous stem cells: a role in lung repair and use in airway tissue engineering and transplantation. *J Biomed Sci* 2010;17:92.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

90. Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, et al. The Role of Scgb1a1+ Clara Cells in the Long-Term Maintenance and Repair of Lung Airway, but Not Alveolar, Epithelium. *Cell Stem Cell* 2009;4:525-34.
91. Liu X, Engelhardt JF. The glandular stem/progenitor cell niche in airway development and repair. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:682-8.
92. Kajstura J, Rota M, Hall SR, Hosoda T, D'Amario D, Sanada F, et al. Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med* 2011;364:1795-806.
93. Steinke M, Gross R, Walles H, Gangnus R, Schutze K, Walles T. An engineered 3D human airway mucosa model based on an SIS scaffold. *Biomaterials* 2014;35:7355-62.
94. Suzuki T, Kobayashi K, Tada Y, Suzuki Y, Wada I, Nakamura T, et al. Regeneration of the trachea using a bioengineered scaffold with adipose-derived stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008;117:453-63.
95. Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, et al. A tissue-engineered trachea derived from a framed collagen scaffold, gingival fibroblasts and adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 2010;31:4855-63.
96. Ramsay CR, Grant AM, Wallace SA, Garthwaite PH, Monk AF, Russell IT. Statistical assessment of the learning curves of health technologies. *Health Technol Assess* 2001;5:1-79.
97. Jovell AJ, Navarro-Rubio MD. [Evaluation of scientific evidence]. *Med Clin (Barc)* 1995;105:740-3.
98. Graham EA, Singer JJ. Landmark article Oct 28, 1933. Successful removal of an entire lung for carcinoma of the bronchus. By Evarts A. Graham and J. J. Singer. *JAMA* 1984;251:257-60.
99. Jichen QV, Chen G, Jiang G, Ding J, Gao W, Chen C. Risk factor comparison and clinical analysis of early and late bronchopleural fistula after non-small cell lung cancer surgery. *Ann Thorac Surg* 2009;88:1589-93.
100. Uramoto H, Hanagiri T. The development of bronchopleural fistula in lung cancer patients after major surgery: 31 years of experience with 19 cases. *Anticancer Res* 2011;31:619-24.
101. Martin J, Ginsberg RJ, Abolhoda A, Bains MS, Downey RJ, Korst RJ, et al. Morbidity and mortality after neoadjuvant therapy for lung cancer: the risks of right pneumonectomy. *Ann Thorac Surg* 2001;72:1149-54.
102. Sonobe M, Nakagawa M, Ichinose M, Ikegami N, Nagasawa M, Shindo T. Analysis of risk factors in bronchopleural fistula after pulmonary resection for primary lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;18:519-23.
103. Athanassiadi K, Kalavrouziotis G, Bellenis I. Bronchopleural fistula after pneumonectomy: a major challenge. *Acta Chir Hung* 1999;38:5-7.
104. Baldwin JC, Mark JB. Treatment of bronchopleural fistula after pneumonectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985;90:813-7.
105. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Garcia LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, et al. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis* 2003;18:451-4.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

106. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodriguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 2005;48:1416-23.
107. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 2009;52:79-86.
108. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007;213:341-7.
109. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009;217:318-24.
110. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9:702-12.
111. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *STEM CELLS* 2007;25:2648-59.
112. Dierkesmann R, Huzly A. Side effects of endobronchial laser treatment. *Endoscopy* 1985;17:49-53.
113. Sakamoto J, Hasegawa S, Ito S, Inui K, Wada H. A case of broncho-mediastinal fistula with primary lung cancer. *J Bronchology Interv Pulmonol* 2004;11:42-4.
114. Borro JM, Ramos F, Vicente R, Sanchis F, Morales P, Caffarena JM. Bronchial fistula to the mediastinum in a heart-lung transplant patient. *Eur J Cardiothorac Surg* 1992;6:674-5; discussion 6.
115. Langendijk H, de Jong J, Tjwa M, Muller M, ten Velde G, Aaronson N, et al. External irradiation versus external irradiation plus endobronchial brachytherapy in inoperable non-small cell lung cancer: a prospective randomized study. *Radiother Oncol* 2001;58:257-68.
116. Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, Vauthey JN, Dindo D, Schulick RD, et al. The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. *Ann Surg* 2009;250:187-96.
117. Stenton C. The MRC breathlessness scale. *Occupational Medicine* 2008;58:226-7.
118. Mor V, Laliberte L, Morris JN, Wiemann M. The Karnofsky Performance Status Scale. An examination of its reliability and validity in a research setting. *Cancer* 1984;53:2002-7.
119. elmedicointeractivo.com. curso de farmacologia clinica aplicada sobre efectos adversos a medicamentos. Available at: <http://2011.elmedicointeractivo.com/farmacia/temas/tema3-4/rea2.htm?botsearch>. 2015.
120. Alvarez PD, Garcia-Arranz M, Georgiev-Hristov T, Garcia-Olmo D. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax* 2008;63:374-6.
121. Gir P, Oni G, Brown SA, Mojallal A, Rohrich RJ. Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 2012;129:1277-90.
122. Andriani F, Facchinetti F, Furia S, Roz L, Bursomanno S, Bertolini G, et al. Adipose tissue displays trophic properties on normal lung cellular components without promoting cancer cells growth. *J Cell Physiol* 2013;228:1166-73.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

123. Hollaus PH, Lax F, Janakiev D, Lucciarini P, Katz E, Kreuzer A, et al. Endoscopic treatment of postoperative bronchopleural fistula: experience with 45 cases. *Ann Thorac Surg* 1998;66:923-7.
124. Bonfield TL, Nolan Koloze MT, Lennon DP, Caplan AI. Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo. *J Inflamm (Lond)* 2010;7:51.
125. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Front Immunol* 2013;4:201.
126. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *Journal of Nippon Medical School* 2009;76:56-66.
127. Collawn SS, Banerjee NS, de la Torre J, Vasconez L, Chow LT. Adipose-derived stromal cells accelerate wound healing in an organotypic raft culture model. *Ann Plast Surg* 2012;68:501-4.
128. Basiouny HS, Salama NM, Maadawi ZM, Farag EA. Effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells on healing of induced full-thickness skin wounds in albino rat. *Int J Stem Cells* 2013;6:12-25.
129. Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, Buard V, Andre M, Cousin B, et al. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:503-10.
130. Petrella F, Spaggiari L, Acocella F, Barberis M, Bellomi M, Brizzola S, et al. Airway fistula closure after stem-cell infusion. *N Engl J Med* 2015;372:96-7.